



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Variación de la actividad antioxidante de extractos
con diferente contenido de bromofenoles del alga roja
Polysiphonia paniculata Montagne procedente de tres
zonas del litoral peruano**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Recursos
Vegetales y Terapéuticos

AUTOR

Belén Guadalupe GONZÁLEZ GONZÁLEZ

ASESOR

César Máximo FUERTES RUITÓN

Lima, Perú

2017



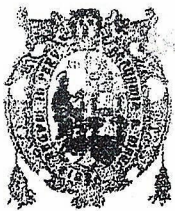
Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

González B. Variación de la actividad antioxidante de extractos con diferente contenido de bromofenoles del alga roja *Polysiphonia paniculata* Montagne procedente de tres zonas del litoral peruano [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2017.



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN RECURSOS VEGETALES Y TERAPÉUTICOS**

Siendo las 15:00 hrs. del 28 de junio de 2017 se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por la Dra. Eloisa Maximina Hernández Fernández e integrado por los siguientes miembros: Dr. Américo Jorge Castro Luna, Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga, Mg. César Máximo Fuertes Ruitón y la Mg. Acela Inés Arneo Salas; para la sustentación oral y pública de la tesis, intitulada: **"VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS CON DIFERENTE CONTENIDO DE BROMOFENÓLES DEL ALGA ROJA *Polysiphonia paniculata* Montagne PROCEDENTE DE TRES ZONAS DEL LITORAL PERUANO"**, presentado por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **BELÉN GUADALUPE GONZÁLEZ GONZÁLEZ**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Muy Bueno (P.P.) Distinguido

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **BELÉN GUADALUPE GONZÁLEZ GONZÁLEZ**, el Grado Académico de Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos.

Siendo las 16:12 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 16:12 hrs. del 28 de junio de 2017.

Eloisa Maximina Hernández Fernández
Dra. Eloisa Maximina Hernández Fernández (P.P., D.E.)
Presidenta

Américo Jorge Castro Luna
Dr. Américo Jorge Castro Luna (P.P., D.E.)
Miembro

Karim Lizeth Jiménez Aliaga
Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga (P. Aux. T.C.)
Miembro

César Máximo Fuertes Ruitón
Mg. César Máximo Fuertes Ruitón (P.P. D.E.)
Miembro - Asesor

Acela Inés Arneo Salas
Mg. Acela Inés Arneo Salas
Miembro

Observaciones:

Dedicatoria

Con amor, a mi esposo Ricardo
por apoyarme con amor y paciencia,
por siempre darme ánimos
y ser mi compañero de vida.

Con todo mi amor a mis hijas
María Teresa y Carla Lucía,
por su amor y comprensión
por las horas robadas
para concluir mi proyecto,
y a quienes quiero dejar el mensaje:
“nunca es tarde para aprender”

A mi madre, que,
aunque ya no está a mi lado,
sé que me acompaña siempre.

Agradecimientos

Mi agradecimiento por siempre a mi asesor, Mg. César Fuertes Ruitón, por ser un verdadero maestro, admirable por su sabiduría, inteligencia y sencillez. Sus sugerencias y apoyo constante me permitieron culminar con éxito mi proyecto.

A los distinguidos miembros del Jurado Examinador y Calificador por sus aportes en la corrección del presente trabajo.

Mi profundo agradecimiento a Heden Vega y Eduardo Malpartida, por su valiosa ayuda, apoyo y colaboración en el desarrollo de mi tesis.

A Gustavo Ruiz, por sus sugerencias e importantes aportes en diversas etapas de mi tesis.

A mi amada familia, que siempre estuvo a mi lado apoyándome y dándome la fortaleza necesaria para seguir adelante.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Situación problemática	1
1.2 Formulación del problema	2
1.3 Justificación de la investigación	2
1.3.1 Justificación teórica	2
1.3.2 Justificación práctica	3
1.4 Objetivos de la investigación	3
1.4.1 Objetivo general	3
1.4.2 Objetivos específicos	4
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	4
2.1 Antecedentes de la investigación	4
2.2 Bases teóricas	9
2.2.1 Género <i>Polysiphonia</i>	9
2.2.2 Especie <i>Polysiphonia paniculata</i>	10
2.2.3.1 Clasificación botánica	10
2.2.3.2 Distribución geográfica a nivel mundial	10
2.2.3.3 Distribución geográfica en Perú	10
2.2.3.4 Descripción botánica	11
2.2.3 Compuestos bromofenólicos	12
2.2.3.1 Biosíntesis de compuestos bromofenólicos	14
2.2.3.2 Actividades biológicas de los compuestos bromofenólicos	15
2.2.3.2.1 Actividad antioxidante	16
2.2.3.2.2 Actividad anticancerígena	19
2.2.3.2.3 Actividad antimicrobiana	21
2.2.3.2.4 Actividad antidiabética	22
2.2.4 La actividad antioxidante	23

2.2.4.1	Especies reactivas de oxígeno	25
2.2.4.2	Sistema antioxidante celular	25
2.2.4.3	Estrés oxidativo, procesos degenerativos y enfermedad	27
2.2.4.4	Antioxidantes	28
2.2.4.5	Antioxidantes en algas marinas	29
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA		32
3.1.	Tipo de estudio	32
3.2.	Recolección del material biológico	32
3.3.	Identificación del material	33
3.4.	Desecado, molienda y almacenaje	33
3.5.	Preparación de los extractos	33
3.6.	Materiales de laboratorio	33
3.7.	Equipos de laboratorio	34
3.8.	Reactivos	34
3.9.	Tamizaje fitoquímico	34
3.10.	Determinación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu	35
3.11.	Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH (1,1difeníl-2-picrilhidrazilo)	36
3.12	Caracterización estructural del metabolito bromofenólico con actividad antioxidante	39
3.12.1	Identificación del grupo fenólico	39
3.12.1.1	Mediante cromatografía en capa fina	39
3.12.1.2	Mediante análisis espectrofotométrico UV-VIS	39
3.12.1.3	Mediante análisis espectrofotométrico infrarrojo	40
3.12.2	Identificación de bromo	41
3.12.2.1	Mediante reacciones químicas cromogénicas	41
3.12.2.2	Mediante técnicas espectroscópicas	42
3.12.3	Aislamiento de fracciones por cromatografía preparativa en capa delgada	45

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
4.1 Análisis e interpretación de resultados	46
4.1.1 Tamizaje fitoquímico	46
4.2 Cuantificación de fenoles totales	46
4.3 Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH	48
4.4 Caracterización estructural del metabolito bromofenólico con actividad antioxidante	50
4.4.1 Identificación del grupo fenólico	50
4.4.1.1 Mediante cromatografía en capa fina	50
4.4.1.2 Mediante método espectrofotométrico UV-VIS	51
4.4.1.3 Mediante punto de fusión	52
4.4.1.4 Mediante método espectrofotométrico infrarrojo	52
4.4.2 Identificación de bromo	53
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	70

ABREVIATURAS

EP:	Éter de petróleo
DCM:	Diclorometano
ERO:	Especies reactivas de oxígeno
GSH:	Glutación
CAT:	Catalasa
GR:	Glutación reductasa
SOD:	Superoxidasa dismutasa
DPPH• :	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
DPPH-H :	1,1,-difenil-2-picril-hidrazina
EAG:	Equivalentes de Ácido Gálico
ICP-MS:	Espectrometría de masa con plasma con acoplamiento inductivo [Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)]
CCF:	Cromatografía en capa fina

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Fenoles halogenados encontrados en especies del género *Polysiphonia*

Tabla 2. Coeficientes de Inhibición (CI50) de la actividad atrapadora de radicales de los compuestos bromofenólicos de la Figura 7

Tabla 3. Ejemplos de radicales libres y especies reactivas de oxígeno

Tabla 4. Concentraciones de extractos utilizados en la determinación de contenido de fenoles totales

Tabla 5. Concentraciones de extractos utilizados en la determinación de la actividad antioxidante. B=Barranco, PS=Pisco, PA=Paracas

Tabla 6. Marcha fitoquímica de los extractos etéreos, diclorometánicos y etanólicos de *Polysiphonia paniculata*, muestras algales recolectadas en Barranco (B), Pisco (PS) y Paracas (Pa)

Tabla 7. Contenido de Fenoles Totales de los extractos en éter, diclorometano y etanol de las tres zonas de recolección

Tabla 8. Valores de CI50 (ug/mL) obtenidos de los extractos de las tres zonas de recolección. EP=éter de petróleo, DCM=diclorometano

Tabla 9. Reporte de resultados de la determinación de bromo por ICP-MS

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Compuestos bromofenólicos de las algas rojas *Polysiphonia morrowii* (1); de *Rhodomela larix* (2) y (3); *Laurencia intermedia* (4) y (5).

Figura 2. Compuestos bromofenólicos de *Polysiphonia urceolata*.

Figura 3. Compuestos bromofenólicos policíclicos de *Polysiphonia urceolata*

Figura 4. *Polysiphonia paniculata* de Bahía Cholla (vecindad de Puerto Peñasco), Sonora

Figura 5. Talo ramificado de *Polysiphonia paniculata*

Figura 6. Biosíntesis propuesta de 2,4,6-tribromofenol a partir de L-tirosina en el alga verde *Ulva lactuca*.

Figura 7. Bromofenoles (BPs) que han demostrado tener actividad antioxidante, BPs 1.1 a 1.11 del alga roja *Symphyocladia latiuscula* y los BPs 1.12 a 1.21 del alga roja *Polysiphonia urceolata*

Figura 8. Bromofenoles del alga *Leathesia nana* con actividad anticancerígena

Figura 9. Bromofenoles de *Rhodomela confervoides* con actividad anticancerígena

Figura 10. Bromofenoles de *Polysiphonia lanosa* con actividad antibacteriana

Figura 11. Bromofenoles de *Rhodomela confervoides* con actividad antidiabética

Figura 12. Esquema de la generación exógena de radicales libres y efectos adversos del estrés oxidativo en la patogénesis de enfermedades

Figura 13. Radical libre neutralizado por un antioxidante

Figura 14. Esquema de reacción del ácido gálico con Molibdemo (VI), componente del reactivo Folin-Ciocalteu

Figura 15. El radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) (color violeta) se reduce en la 1,1-difenil-2-picril-hidrazina (color amarillo) por la acción antioxidante de compuestos que contienen grupos –OH que decoloran dicho reactivo. El radical libre es de larga vida debido a la presencia de los enlaces π de los anillos aromáticos

Figura 16. Esquema del sistema de ionización por plasma (ICP) y el analizador cuadrupolar (MS)

Figura 17. Curva de calibración del ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Figura 18. Determinación del Contenido de Fenoles Totales por el método de Folin-Ciocalteu

Figura 19. Cuadro comparativo de la actividad antioxidante de los extractos de las tres zonas de recolección, según el solvente de extracción. EP=éter de petróleo, DCM=diclorometano

Figura 20. Cromatograma de los extractos DCM de *Polysiphonia paniculata* Montagne. B=Barranco, PS=Pisco y PA=Paracas. Fase móvil: N-butanol:benceno:agua (1:19:20) observado a la luz visible.

Figura 21. Cromatograma de los extractos DCM de *Polysiphonia paniculata* Montagne. B=Barranco, PS=Pisco y PA=Paracas. Fase móvil: N-butanol:benceno:agua (1:19:20), observado a la luz UV 254nm

Figura 22. Cromatograma de los extractos DCM de *Polysiphonia paniculata* Montagne. B=Barranco, PS=Pisco y PA=Paracas. Fase móvil: N-butanol:benceno:agua (1:19:20), observado a la luz UV 365nm

Figura 23. Cromatograma de los extractos DCM de *Polysiphonia paniculata* Montagne. B=Barranco, PS=Pisco y PA=Paracas. Fase móvil: N-butanol:benceno:agua (1:19:20), revelado con ácido fosfomolibdico al 2%, 100°C por 5 min.

Figura 24. Cromatograma a escala preparativa para el aislamiento de compuestos fenólicos en el extracto DCM de *Polysiphonia paniculata* M. recolectada en Paracas.

Figura 25. Ubicación de la fracción 4 en el cromatograma a escala preparativa para el aislamiento de compuestos fenólicos en el extracto DCM de *Polysiphonia paniculata* M. recolectada en Paracas.

Figura 26. Espectro ultravioleta de la fracción 4 de *Polysiphonia paniculata* Montagne recolectada en Paracas.

Figura 27. Ácido 3-(3-bromo-4,5-dihidroxifenil)-2-(3,5-dibromo-4-hidroxifenil) propiónico de *Polysiphonia urceolata*

Figura 28. Espectro IR del extracto DCM de Barranco.

Figura 29. Espectro IR del extracto DCM de Pisco

Figura 30. Espectro IR del extracto DCM de Paracas

Figura 31. Curva de calibración de estándar bromuro de potasio en el análisis de bromo mediante la técnica ICP-MS de los extractos DCM de *Polysiphonia paniculata* Montagne

Figura 32. Curva de calibración del extracto en éter de petróleo de Barranco (método DPPH)

Figura 33. Curva de calibración del extracto en éter de petróleo de Paracas (método DPPH)

Figura 34. Curva de calibración del extracto en éter de petróleo de Pisco (método DPPH)

Figura 35. Curva de calibración del extracto en diclorometano de Barranco (método DPPH)

Figura 36. Curva de calibración del extracto en diclorometano de Pisco (método DPPH)

Figura 37. Curva de calibración del extracto en diclorometano de Paracas (método DPPH)

Figura 38. Curva de calibración del extracto en etanol de Barranco (método DPPH)

Figura 39. Curva de calibración del extracto en etanol de Pisco (método DPPH)

Figura 40. Curva de calibración del extracto en etanol de Paracas (método DPPH)

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la variación de la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos etéreos, diclorometánicos y etanólicos del alga roja *Polysiphonia paniculata* Montagne de tres zonas del litoral peruano. Las zonas de recolección fueron: playa Barranco de Barranco-Lima, playa Punta Rocas de Pisco-Ica y playa Lagunillas de Paracas-Ica. Diversas especies del género *Polysiphonia*, han sido reportadas por presentar compuestos bromofenólicos con actividad antioxidante. La actividad antioxidante se determinó utilizando el método del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), los resultados revelaron que los extractos diclorometánicos presentan mayor actividad antioxidante en comparación con los extractos etéreos y etanólicos. Los extractos diclorometánicos en el análisis de DPPH presentaron una concentración inhibitoria media (CI₅₀) de 357 µg/mL (Barranco); 366.6 µg/mL (Pisco) y 300.19 µg/mL (Paracas) respectivamente; comparados con la Vitamina C, que presentó un valor de CI₅₀ de 2.4 µg/mL. El contenido de fenoles totales fue determinado a todos extractos por el método de Folin- Ciocalteu, el mayor contenido de fenoles totales lo presentó el extracto diclorometánico de Barranco con 1.752mg/Eq de ácido gálico/g de extracto seco. Los espectros Infrarrojos de los extractos diclorometánicos exhibieron una banda de absorción a 719 cm⁻¹ que indica la presencia de bromo. Mediante método colorimétrico con el reactivo de fluoresceína se identificó la presencia de bromo, la cual fue corroborada por espectrometría inductiva de plasma acoplada a espectro de masa (ICP-MS). Se concluye que los extractos diclorometánicos presentan mayor actividad antioxidante atribuido a la presencia de compuestos bromofenólicos de baja polaridad. Las muestras algales obtenidas en la playa Lagunillas de Paracas-Ica presentaron mayor actividad antioxidante.

Palabras clave: Rodophyta, Polysiphonia, bromofenol, actividad antioxidante, DPPH, espectro IR.

SUMMARY

The present study has as to evaluate the variation of the antioxidant activity *in vitro* of ethereal, dichloromethane and ethanolic extracts of the red alga *Polysiphonia paniculata* Montagne from three zones of the Peruvian coast. The collection areas were: Barranco beach Barranco-Lima, Punta Rocas beach of Pisco-Ica and Lagunillas beach of Paracas-Ica. Several species of the genus *Polysiphonia* have been reported to present bromophenolic compounds with antioxidant activity. The antioxidant activity was determined using the free radical 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) method, the results revealed that the dichloromethane extracts exhibit higher antioxidant activity compared to ethereal and ethanolic extracts. The dichloromethane extracts in the DPPH analysis had a mean inhibitory concentration (IC₅₀) of 357 µg/mL (Barranco); 366.6 µg/mL (Pisco) and 300.19 µg/mL (Paracas) respectively; Compared with Vitamin C, which presented an IC₅₀ value of 2.4 µg/mL. The content of total phenols was determined in all extracts by the Folin-Ciocalteu method, the highest content of total phenols was presented by the dichloromethane extract of Barranco with 1.752 mg/Eq of gallic acid/g of dry extract. Infrared spectra of the dichloromethane extracts exhibited an absorption band at 719 cm⁻¹ indicating the presence of bromine. The presence of bromine was identified by colorimetric method with the fluorescein reagent, which was corroborated by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS).

It is concluded that the dichloromethane extracts present higher antioxidant activity attributed to the presence of bromophenolic compounds of low polarity. The algae samples obtained at the Lagunillas beach of Paracas-Ica presented higher antioxidant activity.

Keywords: Rodophyta, Polysiphonia, bromophenol, antioxidant activity, DPPH, IR spectrum

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Situación problemática

En los últimos años viene desarrollándose un mayor interés por los problemas relacionados con el estrés oxidativo, los radicales libres, las especies reactivas del oxígeno (ERO) y los antioxidantes.

Existen varios trabajos en los cuales se expone la relación existente entre el estrés oxidativo y algunas enfermedades, N.F. Boyd y V. Mc Guire en 1991 realizaron un estudio en 37 450 mujeres que tenían el diagnóstico de displasia mamaria, y encontraron elevación de los niveles de lípidos peroxidados. El Linxian General Population Study realizado en una población china de 30 000 personas mostró una reducción significativa del cáncer de estómago en aquellos que ingirieron suplementos de antioxidantes. El estudio Monograph and Multimedia Sourcebook (MONICA) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) mostró una correlación inversa entre los niveles de vitamina E y la mortalidad por infarto del miocardio en 16 ciudades europeas. El Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS) agrupó a 2 000 pacientes con enfermedad coronaria comprobada por coronariografía, que fueron divididos en 2 grupos: a uno se le administró un placebo y al otro 800 UI de vitamina E; después de un seguimiento de 510 días se observó una disminución de la mortalidad por infarto del miocardio en el grupo tratado (Venero, 2002).

La importancia de estos estudios radica en que existe un consenso general de que los procesos peroxidativos desempeñan un papel importante en la patogénesis de varias enfermedades, como los procesos neurodegenerativos, el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y daño hepático, e inclusive en procesos naturales como el envejecimiento. De esta manera, los compuestos antioxidantes utilizados como aditivos alimentarios o como suplementos farmacéuticos, pueden neutralizar el efecto dañino de los radicales libres en las células del organismo antes de que causen la oxidación de las biomoléculas y, por tanto, pudieran ayudar a la prevención de muchas de estas enfermedades asociadas a las especies reactivas del oxígeno (ERO) (Batista et al., 2009).

Por otro lado, existe el interés de buscar nuevos aditivos para alimentos, en sustitución de antioxidantes sintéticos como hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT), los cuales han mostrado daño en el hígado y carcinogénesis (Munir et al., 2013)

En consecuencia, los resultados de estos estudios sugieren la necesidad de buscar nuevas fuentes naturales de compuestos con propiedades antioxidantes que puedan ser formulados como suplementos farmacéuticos y/o utilizados en la industria alimentaria.

Los organismos marinos han probado ser una fuente potencial de compuestos con actividad biológica y representan un recurso que no ha sido explotado muy ampliamente desde este punto de vista.

1.2 Formulación del Problema

¿La presencia de metabolitos del tipo bromofenólico hacen variar la capacidad antioxidante de los extractos del alga *Polysiphonia paniculata* Montagne obtenida de tres zonas del litoral peruano?

1.3 Justificación de la Investigación

1.3.1 Justificación teórica

Se ha documentado que el proceso de síntesis y excreción de compuestos polifenólicos en algas marinas es un mecanismo de defensa contra el herbivorismo y niveles altos de radiación UV y PAR (Radiación Fotosintéticamente Activa). La concentración de florotaninos en el alga *Lessonia nigrescens*, por ejemplo, aumenta según se incrementa el nivel de radiación UV. La excreción de coumarinas en el alga verde *Dasycladus vermicularis* aumenta cuatro veces a mayores niveles de PAR. Un incremento de los compuestos polifenólicos en el agua circundante reduce la transmisión de luz y protege a las algas contra niveles altos de radiación UV y PAR (Abdala-Díaz et al., 2014).

Algunos investigadores consideran que las algas rojas son la fuente principal de compuestos fenólicos halogenados como los bromofenoles (Bravo, 2008).

Estudios previos indican que los bromofenoles son los principales componentes en algas de la Familia Rhodomelaceae (Dembitsky et al., 2003). Dentro de la familia Rhodomelaceae se encuentra el género *Polysiphonia*, y varias especies de este género han sido reportadas conteniendo compuestos bromofenólicos. Publicaciones científicas reportan que extractos de la especie *Polysiphonia urceolata* presentan actividad antioxidante debido a la presencia de compuestos polifenólicos bromados, así la publicación de Li y col. reporta la presencia de bromofenoles los cuales son evaluados para determinar su actividad antioxidante mediante la técnica de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH); todos los compuestos reportados exhiben una actividad antioxidante significativa (Echevarria et al., 2009; Li et al., 2008). En particular, la especie *Polysiphonia paniculata* Montagne ha sido estudiada en Perú demostrando que presenta actividad antibacteriana (Balta, 1988), de acuerdo a la literatura científica esta especie podría presentar también actividad antioxidante.

1.3.2 Justificación práctica

Actualmente la búsqueda de compuestos con actividad antioxidante en los organismos marinos, particularmente en las macroalgas, ha interesado a un mayor número de investigadores. Sin embargo, los trabajos de aislamiento de dichas sustancias son escasos y la investigación sobre la posibilidad de que éstos sean utilizados como medicamentos con aplicación específica para el hombre es escasa. Algunas de estas sustancias pueden presentar actividad antioxidante y ser útiles para bloquear el efecto negativo de los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno generados por el estrés oxidativo.

A la fecha en nuestro país, se reportan escasos estudios de actividad antioxidante en extractos de algas marinas., por tal motivo este estudio evaluará la actividad antioxidante de los extractos del alga roja *Polysiphonia paniculata* Montagne y su variación según su procedencia de tres zonas del litoral peruano, con la finalidad de proporcionar alternativas terapéuticas con efecto antioxidante de origen natural a las personas, quienes de manera continua están expuestas a los efectos oxidativos de los radicales libres

producto del metabolismo. Así como una alternativa de antioxidante natural que pueda ser utilizado en la industria de alimentos.

1.4 Objetivos de la Investigación

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la variación de la actividad antioxidante de los extractos etéreos, diclorometánicos y etanólicos del alga roja *Polysiphonia paniculata* Montagne de tres zonas del litoral peruano.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Determinar el contenido fenólico de los extractos de las algas recolectadas en 3 zonas del litoral peruano mediante el método Folin-Ciocalteu.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos de las algas recolectadas en 3 zonas del litoral peruano mediante el método DPPH.
- Obtener un extracto con alto contenido de bromofenoles.
- Identificar la presencia de compuestos bromofenólicos presentes en el extracto con mayor actividad antioxidante.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de investigación

El interés de encontrar drogas desde el mar comenzó en los años 1970's. Desde entonces, aproximadamente 300 patentes sobre productos naturales marinos han sido reportados entre 1969 y 1999. Así, más de 10 000 compuestos han sido aislados desde organismos marinos. El ambiente marino contiene más del 80% de especies vegetales y animales del mundo.

En años recientes muchos compuestos bioactivos han sido extraídos de varias especies marinas y durante la década del 2000, más de 4 200 nuevos compuestos han sido aislados desde aguas poco profundas a los 900 metros

de profundidad del mar. Las algas marinas que crecen casi exclusivamente en aguas poco profundas de los océanos, proveen comida a diferentes animales marinos y son material valioso para el hombre como alimento y material industrial, como fuente de agar, carragenanos, ácido algínico y fucoidanos; asimismo, son una fuente rica de metabolitos secundarios que incluyen terpenos, acetogeninas, alcaloides, compuestos polifenólicos, muchos de ellos halogenados (Jirge, 2010).

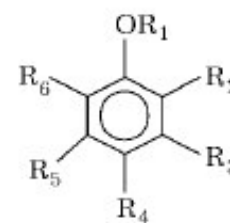
Las propiedades biológicas de los compuestos halogenados han sido investigados desde décadas pasadas, con resultados que demuestran actividad antibacteriana, antioxidante, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, antiproliferativa, citotóxica, ictiotóxico e insecticida (Cabrita et al., 2010; Li et al. 2007).

Diversos estudios realizados en algas rojas indican que la Familia Rhodomelaceae tiene como componentes principales a los bromofenoles (Liu et al., 2006). Dentro de la familia Rhodomelaceae se encuentra el género *Polysiphonia*, y varias especies de este género han sido reportadas conteniendo compuestos bromofenólicos, así en la Tabla 1 se citan diferentes compuestos fenólicos halogenados como el Bromocathecol (compuesto 22) el cual fue encontrado en las algas rojas *Polysiphonia nigra*, *P. elongata*, *P. fascista*, *P. lanosa*, *P. morrowii*, *P. nigrescens* y *P. urceolata*. Lanosol (compuesto 23) es un tóxico generado por algas rojas y pardas, entre las algas rojas tenemos a *Polysiphonia brodiaei*, *P. elongata*, *P. lanosa*, *P. fruticulosa*, *P. nigra*, *P. nigrescens* y *P. urceolata*. También lo encontramos bajo la forma de Lanosol metilato (compuesto 24), descubierto en las algas rojas *Polysiphonia brodiaei*, *P. nigrescens*, *P. urceolata*. El metabolito 26 fue encontrado en *Polysiphonia brodiaei*, *P. nigrescens*, *P. urceolata* y *P. lanosa*. En la especie *Polysiphonia urceolata* se encontró el metabolito 27. Benzaldehído (metabolito 28) es generado en las algas *Polysiphonia elongata*, *P. fruticulosa*, *P. brodiaei*, *P. lanosa*, *P. nigrescens*, *P. urceolata*, *P. violacea*, entre otras. El bromofenol (metabolito 31) está presente en *Polysiphonia urceolata* de las costas de Japón y en la costa sur de Francia. Así también en *P. lanosa* y *P. nigrescens*. Tribromofenol (metabolito 32) está presente en extractos de *Polysiphonia lanosa*, *P. nigrescens*, entre otros. El metabolito 33 fue encontrado en *Polysiphonia*

lanosa y *P. nigrescens*. El alcohol bromobencilo (metabolito 34) fue aislado de *Polysiphonia brodiaei*, *P. nigra* y *P. urceolata*. El fenol 36 que contiene cloro y bromo fue aislado desde *Polysiphonia nigrescens* (Dembitsky y Tolstikov, 2003).

Tabla 1. Fenoles halogenados encontrados en especies del género *Polysiphonia* (Dembitsky y Tolstikov, 2003).

Phenol compound No.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
22	H	Br	H	CHO	Cl	OH
23	H	Br	Br	CH ₂ OH	H	OH
24	H	Br	Br	CH ₂ OCH ₃	H	OH
25	SO ₃ K	Br	Br	CH ₂ OSO ₃ K	H	OH
26	H	Br	H	CH ₂ OH	H	Br
27	H	Br	H	CHO	H	Br
28	H	Br	Br	CHO	H	OH
29	H	Br	H	CH ₂ COOH	H	Br
30	H	Br	H	CH ₂ COCOOH	H	Br
31	H	Br	H	CH ₂ OH	H	OH
32	H	Br	Br	CH ₂ OH	Br	OH
33	H	Br	Br	CH ₂ OC ₃ H ₇	H	OH
34	H	Br	H	CH ₂ OH	H	H
35	H	Br	OH	Br	OH	H
36	H	Br	H	Cl	H	Cl



Estudios realizados en el alga *Polysiphonia sphaerocarpa* reportaron el hallazgo de los compuestos 2,4-dibromoanisol, 2,4,6-tribromoanisol, 3-bromocresol, 3,5-dibromocresol, 3-bromo-4-hidroxibenzaldehído, 3,5-dibromo-4-hidroxibenzaldehído, 2-bromofenol, 4-bromofenol, 2,4-dibromofenol, 2,6-dibromofenol and 2,4,6-tribromofenol los que fueron identificados por cromatografía de gases con espectro de masa (Flodin y Whitfield, 2000).

Doshi y col. consideran que la mayoría, sino todas, las algas rojas del género *Polysiphonia* contienen fenoles bromados que son responsables de su actividad antibacteriana. Asimismo señalaron que, en 1955, Saito y Anto

describen el aislamiento de 5-bromo-3,4-dihidroxibenzaldehído (1) desde *Polysiphonia morrowii*. En 1966, Katsui aisla 2,3-dibromo-4,5-dihidroxibenzaldehído (2) y 2,3-dibromo-4,5-dihidroxi-1'-metoxitolueno (3) desde *Rhodomela larix*. Las algas rojas del género *Laurencia* contienen sesquiterpenos fenólicos y fenoles brominados como sus metabolitos antibióticos. Laurinterol (4) y debromolaurinterol (5) fueron aislados por primera vez de *Laurencia intermedia* y han sido aislados de otras especies del género *Laurencia*. Los compuestos (4) y (5) inhiben a *S. aureus*, *M. smegmatis* y *C. albicans* (Doshi et al., 2011).

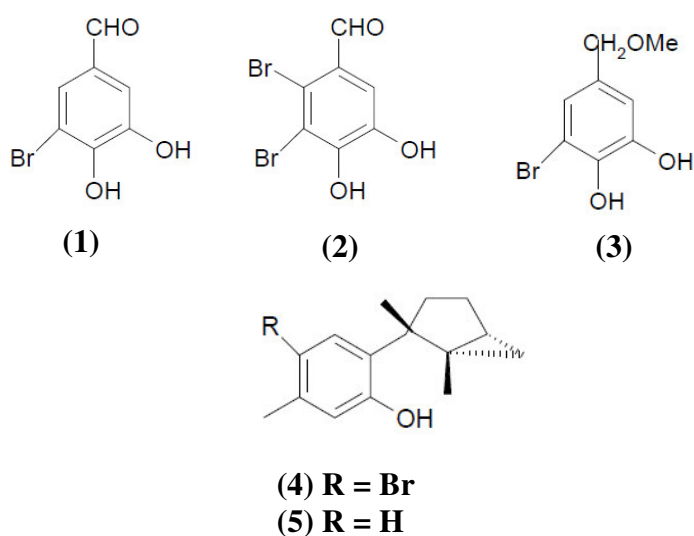


Figura 1. Compuestos bromofenólicos de las algas rojas *Polysiphonia morrowii* (1); *Rhodomela larix* (2) y (3) y *Laurencia intermedia* (4) y (5). (Doshi et al., 2011)

Otras publicaciones científicas reportan que especies del género *Polysiphonia* presentan actividad antioxidante; Je et al. reporta que extractos de *Polysiphonia morrowii* presentan actividad antioxidante (Je et al., 2009); extractos de la especie *Polysiphonia urceolata* tiene actividad antioxidante debido a la presencia de compuestos polifenólicos bromados, así la publicación de Li y col. reportó la presencia de bromofenoles de fórmulas (6) a (9) (Figura 2) los cuales fueron evaluados para determinar su actividad antioxidante mediante la técnica de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), todos los compuestos exhibieron una actividad antioxidante significativa (Li et al., 2007).

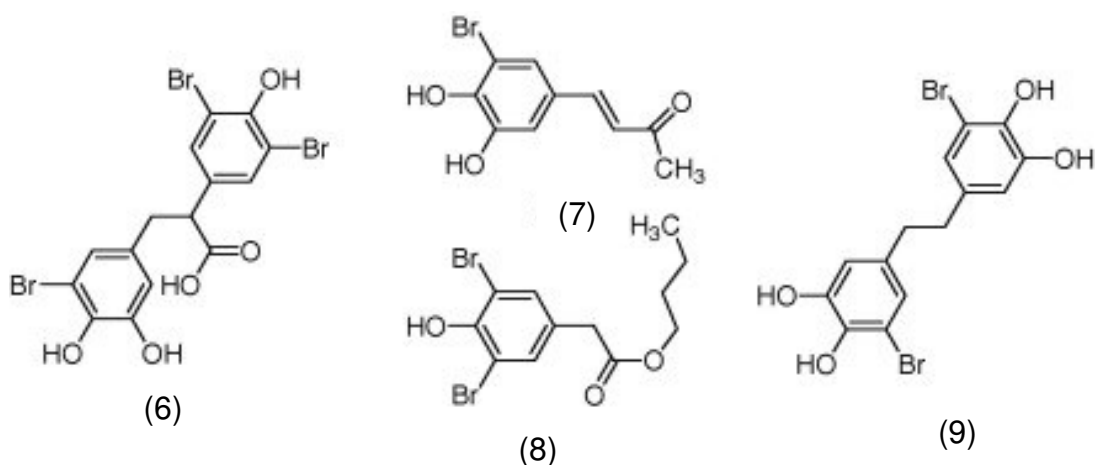


Figura 2. Compuestos bromofenólicos de *Polysiphonia urceolata* (Li et al., 2007).

Li K. y col. aislan e identifican los bromofenoles (10 a 12) y Urceolatin (13) (Figura 3) del alga roja *Polysiphonia urceolata* y se evalúan para determinar su actividad antioxidante mediante la técnica de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y todos son potentes antioxidantes (Li, Gloer, 2008; Li, Li, 2008).

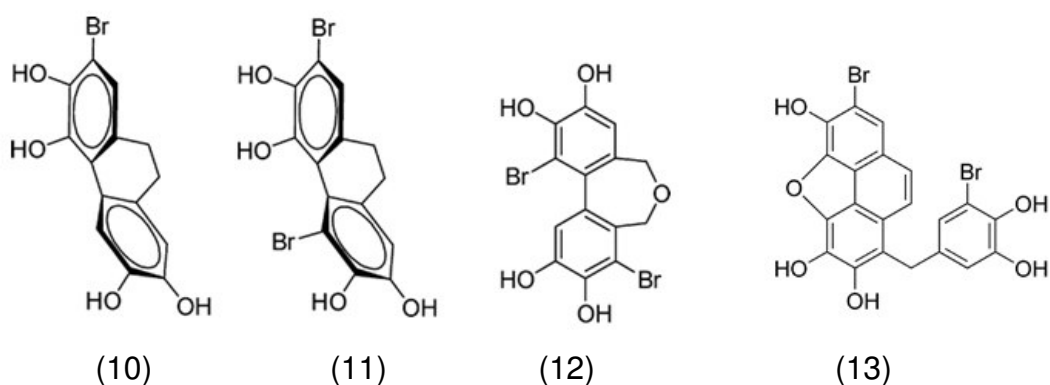


Figura 3. Compuestos bromofenólicos policíclicos de *Polysiphonia urceolata* (Li, Gloer, 2008; Li, Li, 2008).

Kellman y col. realizaron un estudio de actividad antioxidante de diferentes especies de algas marinas, entre ellas *Polysiphonia urceolata*, la cual exhibió la actividad antioxidante más alta de todos los géneros de algas rojas evaluados, considerándola como una prometedora fuente natural de

antioxidantes y también con un amplio rango de compuestos bioactivos (Kellmann et al., 2012).

El alga *Polysiphonia lanosa* es reconocida como una especie con fuerte actividad antioxidante utilizada en suplementos y productos de salud y belleza. Los extractos de esta especie tienen actividad citotóxica, antioxidante, antibacterial y antifúngica (Se-Kwon Kim, 2015).

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Género *Polysiphonia*

El género *Polysiphonia* Greville, comprende alrededor de 150 especies descritas de algas rojas que taxonómicamente se distinguen por diversos caracteres, entre los que se incluyen atributos morfológicos, como el número de células pericentrales por segmento axial, el origen de los rizoides, las ramas y cuerpos espermatangiales y la frecuencia de tricoblastos. Entre las propiedades reproductoras se encuentran la disposición de los tetrasporangios y algunas características del procarpo; en concreto, el número de células que constituyen la rama carpogonial (Aguilar-Rosas et al., 2006).

Los registros más antiguos de *Polysiphonia* Greville en el Golfo de California fue proporcionado por Setchell and Gardner (1924), quienes describen 3 nuevas especies. Luego, Dawson (1944), incluyendo una nueva especie. Un estudio detallado de la taxa de *Polysiphonia* del Golfo de California y la costa del Pacífico de Baja California fue presentado por primera vez por Hollenberg (1961) (Hollenberg et al., 1977).

2.2.2 *Polysiphonia paniculata* Montagne

2.2.2.1 Clasificación botánica

División Rhodophyta

Clase	Florideophyceae
Subclase	Rhodymeniophycidae
Orden	Ceramiales
Familia	Rhodomelaceae
Tribu	Polysiphonieae
Género	<i>Polysiphonia</i>
Especie	<i>Polysiphonia paniculata</i> Montagne (Algae base.org)

2.2.2.2 Distribución geográfica a nivel mundial

Europa: Mar Adriático (Gómez Garreta et al. 2001), Mar Negro (Gómez Garreta et al. 2001), Francia (Ben Maiz, Boudouresque, Lauret & Riouall 1988, Gómez Garreta et al. 2001, Verlaque 2001, Anon. 2012), Turquía (Europa) (Zeybek, Güner & Aysel 1993, Taskin et al. 2008). Islas Atlántico: Salvage Islands (Audiffred & Weisscher 1984, John et al. 2004).

Asia: Turquía (Asia) (Taskin et al. 2008).

América del Norte: Alaska (Scagel et al. 1989), British Columbia (Scagel et al. 1989), California (Abbott & Hollenberg 1976, Silva 1979, Scagel et al. 1989, Stewart 1991, Zuccarello, Moon & Goff 2004, Miller 2012, Augyte & Shaughnessy 2014), Oregon (Hansen 1997, Augyte & Shaughnessy 2014), Washington (Scagel et al. 1989), Golfo de California (Dawson 1944).

América del Sur: Perú (Lobban & Tsuda 2003), Chile (Santelices 1989, Hoffmann & Santelices 1997, Lobban & Tsuda 2003).

2.2.2.3 Distribución geográfica en Perú

Polysiphonia paniculata Montagne:

- Dawson 24428 Chancay
- Dawson 24439, 24579 corner 2 Ancón
- Acleto 667 Ancón
- Dawson 24421 Barranco
- Cerrate 2950 Barranco
- Dawson 24436 corner 1 Pucusana

- Pisco
- Paracas
- Ilo

Polysiphonia confusa-Ancón

Polysiphonia subtilissima-Ancón

Polysiphonia flaccidissima-Ancón y Talara

Una colección de Gaudichaud en el Montagne herbarium Museum d'Historie Naturelle, París. (Yale et al., 1964)

2.2.2.4 Descripción botánica

Desde el punto de vista botánico *Polysiphonia paniculata* M. tiene talo denso, de color rojo pardo oscuro, de 10-25 cm de largo, ramificaciones densamente plumosas, enmarañadas, unidas por numerosos rizóides unicelulares, con ápices generalmente digitados, unidas en la base, las ramificaciones son muy delgadas (menos de 2 mm. de diámetro) y cilíndricas; las células pericentrales en son en su mayoría 10-12, pero a veces llegan hasta 14 en las partes más antiguas o tan sólo 8 en las partes más jóvenes (Hollenberg et al.,1977).

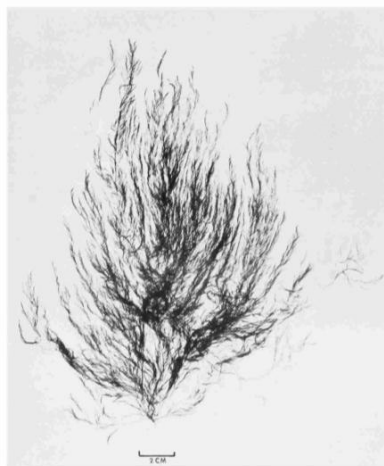


Figura 4. *Polysiphonia paniculata* de Bahía Cholla (vecindad de Puerto Peñasco), Sonora. (Hollenberg et al.,1977)

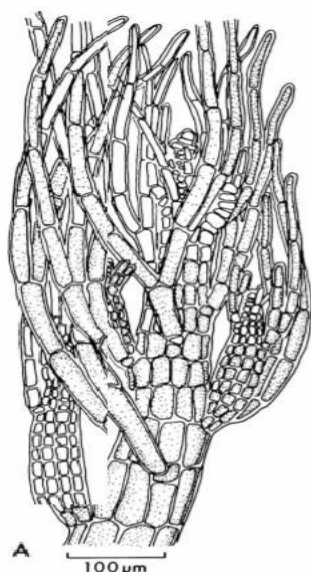


Figura 5. Talo ramificado de *Polysiphonia paniculata* (Hollenberg et al., 1977)

2.2.3 Compuestos Bromofenólicos

Las plantas vasculares sintetizan una gran cantidad de moléculas orgánicas, como consecuencia de su metabolismo secundario. Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales y la defensa ante los factores adversos del ambiente. Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal (Robbins, 2003).

Los compuestos fenólicos se consideran como una de las clases más importantes de antioxidantes naturales. Sus moléculas están formadas por uno o más anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilo. Químicamente, los polifenoles se pueden dividir en varias clases, tales como ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos), flavonoides (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, flavanoles,

antocianinas), isoflavonas (isoflavonas, coumestans), estilbenos, lignanos y polímeros fenólicos (proantocianidinas, taninos condensados y taninos hidrolizables). Se han identificado varios miles de estructuras polifenólicas como metabolitos secundarios de las plantas. Los polifenoles se producen principalmente en frutas y bebidas, como té, vino y café, y también en verduras, leguminosas y cereales (Machu L., 2015)

Los compuestos fenólicos tienen una gran capacidad antioxidante, considerada la actividad biológica responsable del efecto preventivo sobre algunas enfermedades de origen cardiaco e inmunológico. Dentro de esta gran familia pueden encontrarse tres grupos principales: los ácidos fenólicos, los polifenoles y los flavonoides, siendo estos últimos el grupo más común. La finalidad o mecanismo de estos compuestos reside en su capacidad para captar los radicales libres que se pueden generar en las células del cuerpo humano y que son resultado de la combinación de muchos factores ambientales, incluida la contaminación atmosférica. Dichos radicales actúan sobre ácidos grasos poliinsaturados, colesterol, ADN y lípidos, siendo estos últimos los más susceptibles a la sustracción de un electrón por parte del radical que lo requiere para alcanzar su estabilidad electroquímica. Los antioxidantes actúan como fuentes de hidrógeno y se oxidan en lugar de cualquiera de los componentes anteriormente mencionados, protegiendo de esta manera las células contra el daño que causan los radicales libres (Bravo, 1998).

Los compuestos fenólicos se encuentran en los organismos marinos como compuestos bromofenólicos, metabolitos secundarios marinos comunes. Los bromofenoles son aislados e identificados desde diferentes algas marinas, incluyendo las algas rojas, pardas y verdes. También han sido encontrados en ascidias y esponjas. Cientos de bromofenoles han sido aislados desde algas marinas y sus bioactividades han sido estudiadas. Con la finalidad de mejorar su actividad derivados bromofenólicos han sido sintetizados y se ha estudiado su relación entre estructura y actividad (Lin & Liu, 2012).

Tal como ya se ha señalado, los compuestos bromofenólicos han sido considerados como uno de los componentes responsables de la propiedad antioxidante de los organismos marinos, en especial las algas.

2.2.3.1. Biosíntesis de los compuestos bromofenólicos

Los organismos marinos, incluyendo las algas que habitan en la zona intermareal, están expuestos a radicales libres y otros agentes oxidantes. Por consiguiente, las algas marinas sintetizan las enzimas protectoras (por ejemplo, superóxido dismutasa, peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa) y los compuestos antioxidantes (como los florotaninos, fosfolípidos, ácido ascórbico, carotenoides, bromofenoles, catequinas, aminoácidos tipo micosporina, polisacáridos) como mecanismo de defensa. Además de las enzimas, las algas y plantas superiores sintetizan los polifenoles estructurales que también poseen una alta capacidad antioxidante (Abdala-Díaz et al., 2014).

En contraste con las algas de color marrón y verde, las algas rojas son más conocidas por producir metabolitos halogenados, particularmente con bromo y yodo. Las órdenes de Nemaliales, Gigartinales, Ceramiales, Rhodymeniales y Cryptonemiales han demostrado estar comprometidas en halogenaciones biológicas que producen una gran variedad de compuestos orgánicos (Oumaskour et al., 2013).

También se sabe que varias especies de algas marinas contienen bromofenoles simples y un gran número de otros compuestos bromados, estos bromofenoles tienen un impacto en el sabor de los peces que se alimentan de algas marinas. Por ejemplo. 2,6-dibromofenol, con una concentración umbral de 60 ng/kg de carne de gambas impartirá un sabor de yodo a la carne, restringiendo así al omnívoro *Girella tricuspidata*. Muchos bromofenoles se producen en las algas marinas, diversas especies de algas contienen haloperoxidasas, enzimas capaces de halogenar sustratos orgánicos en presencia de iones haluro y peróxido de hidrógeno. En un extenso estudio realizado por Hewson y Hager en 1980, 55 de 72 especies de algas mostraron actividad de bromoperoxidasa y el aislamiento y caracterización de haloperoxidasas de algas ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, hay poca información disponible sobre la biosíntesis de bromofenoles en las algas. Se ha demostrado que bromoperoxidasas pueden bromar al fenol para formar bromofenoles (Flodin & Whitfield, 1999).

Los bromfenoles comparten uno o varios anillos benceno, con un variado grado de sustituyentes bromo e hidroxilo (Liu et al., 2011).

Muchos de los productos naturales halogenados bioactivos de las macroalgas marinas son derivados de ácidos grasos, terpenoides y aminoácidos precursores. La captación de halógeno y su incorporación en el producto natural algal, se piensa es gobernado primariamente por haloperoxidasas vanadio-dependiente (V-BrPOs). Las V-BrPOs han sido recién caracterizadas en algas rojas y pardas. La biosíntesis de bromfenoles fue investigado en el alga verde *Ulva lactuca* en la cual se analiza el contenido de bromfenol y la actividad de la bromoperoxidasa. La brominación de una serie de compuestos fenólicos con un extracto crudo del alga libre de células establece que el ácido 4-hidroxibenzoico (14) es el precursor de 2,4,6-tribromofenol (15), que también produce 4-bromofenol y 2,4-dibromofenol (Moore, 2006).

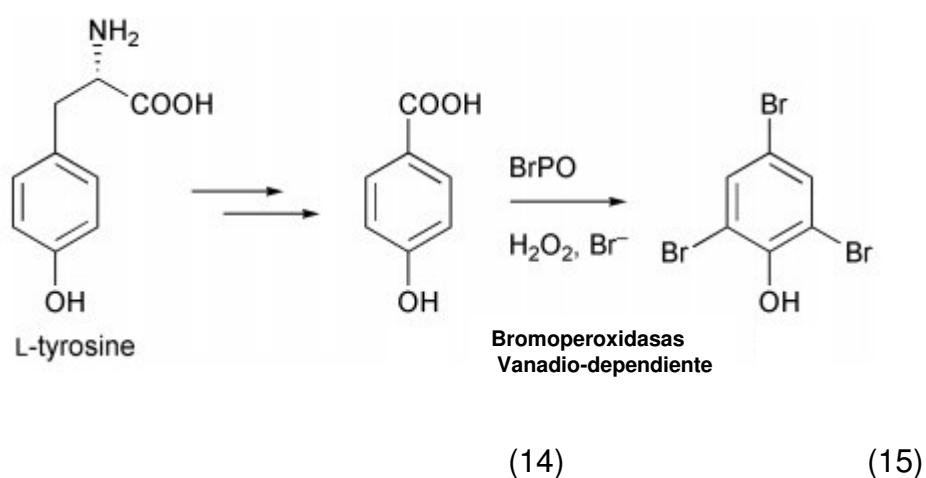


Figura 6. Biosíntesis propuesta de 2,4,6-tribromofenol a partir de L-tirosina en el alga verde *Ulva lactuca*. (Moore, 2006).

2.2.3.2 Actividades biológicas de los compuestos bromofenólicos

En años recientes, un incrementado número de compuestos se han aislado desde las algas marinas y muchos de ellos han reportado de poseer interesante actividades biológicas. Uno de estos compuestos derivados son

los bromofenoles (BPs). Los primeros dos bromofenoles se aislaron del alga roja *Rhodomelia larix* y luego, muchos nuevos BPs se han aislado e identificado desde diversas especies de algas marinas, incluyendo las algas rojas, pardas y verdes (Liu et al, 2011).

2.2.3.2.1 Actividad Antioxidante de los compuestos bromofenólicos

Las algas marinas son consideradas como una rica fuente de compuestos antioxidantes. Consecuentemente la actividad antioxidante es intensamente enfocada debido a la creciente demanda por parte de la industria farmacéutica donde hay interés en compuestos bioactivos naturales antiedad y anticarcinogénico, que poseen beneficios saludables. Las especies oxígeno reactivas (ROS) como anión (O_2^-), radical hidroxilo (OH) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son formados durante la vida aeróbica como resultado del metabolismo del oxígeno. El DNA, las membranas celulares, las proteínas y otros constituyentes celulares son sitios diana de los procesos de degradación y consecuentemente inducen diferentes tipos de enfermedades humanas incluyendo aterosclerosis, artritis reumatoide, distrofia muscular, cataratas, algunos desórdenes neurológicos, y algunos tipos de cáncer, así como el envejecimiento. Sobre todo los ROS causan el deterioro de la calidad de los alimentos, que conducen a rancidez, toxicidad y destrucción de biomoléculas importantes en el metabolismo fisiológico. Además, los antioxidantes de fuentes naturales incrementan la vida media de los alimentos. Por lo tanto, el consumo de antioxidante y la adición de antioxidantes en los alimentos protegen el cuerpo así como los alimentos contra estos eventos (Bouhlal et al, 2013).

Un número creciente de resultados indica que los BPs tienen una potencial actividad antioxidante, principalmente determinado por el 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH) método de atrapamiento de radicales. Por ejemplo, los BPs 1.1–1.11 (Figura 7) aislados del alga roja *Symphycloadia latiuscula*, es reportada de poseer actividad atrapadora de radicales (DPPH). Todos estos BPs están completamente sustituidos por diferentes grupos y altamente brominados, y principalmente ellos poseen una unidad 3,4-dihidroxi-2,5,6-

tribromobenciloxi en la molécula. Estos BPs muestran actividad atrapadora de radicales (DPPH). El compuesto 1.2 tiene la actividad más alta, mientras que el compuesto 1.11 muestra la más baja, con CI50 de 7.5 y 24.7 μM respectivamente. Aun así, ambos son más potentes que el control positivo hidroxitoluenobutilado (CI50 = 81.8 μM). Parece que la actividad antioxidante puede tener una conexión cercana al número de grupos hidroxilo en la molécula. Sobre todo, la unidad 3,4-dihidroxi-2,5,6-tribromobenciloxi o derivados de la misma pueden ser otro importante factor para su actividad. Una serie de BPs aislados del alga roja *Polysiphonia urceolata* también exhibe una significativa actividad antioxidante. Estos BPs (1.12 a 1.21, figura 7), son sustituidos a diferentes grados y todos ellos muestran actividad atrapadora de radicales. Los compuestos 1.18 y 1.19, tienen 4 grupos hidroxilo en las moléculas, son los más activos, con valores de CI50 de 6.8 y 6.1 μM , respectivamente. En contraste, el compuesto 1.17, que solamente tiene un sustituyente hidroxilo en la molécula, es el menos activo con un CI50 de 35.8 μM . Por lo tanto, esto soporta la idea que el número de grupos hidroxilo en las moléculas juega un rol para la actividad antioxidante. Otro factor importante es la conjugación (en el sentido químico), como se ve por comparación de los compuestos 1.19 y 1.15. el primero tiene conjugación en el esqueleto dihidrofenantreno. Los efectos de la conjugación también pueden ser llevados a cabo por sustituyentes como nitro, acetyl o grupos aldehído en posición para- al grupo hidroxilo. Por comparación de los CI50 de 1.5 y 1.15, y de 1.18 y 1.19, parece que la brominación no es un factor determinante. La brominación disminuye la actividad ligeramente en el caso de 1.5 y 1.15, mientras que la brominación lo incrementa ligeramente para 1.19 vs 1.18. En otra comparación entre BPs naturales y sus correspondientes compuestos debromados, se encuentra que la brominación también conduce a una disminución en la actividad antioxidante. Por lo tanto, la brominación en los presentes BPs resultan de poca importancia para sus actividades antioxidantes. Es obvio que el arreglo 1,4-dihidroxi es muy adecuado para actividad antioxidante. A la fecha, 30 BPs de algas marinas se han reportado con actividad antioxidante. Sin duda, estudios recientes revelan que los BPs son candidatos potenciales en la prevención de

enfermedades relacionadas al ataque de radicales libres, como cáncer, diabetes, neurodegeneración e inflamación (Liu M. et al., 2011).

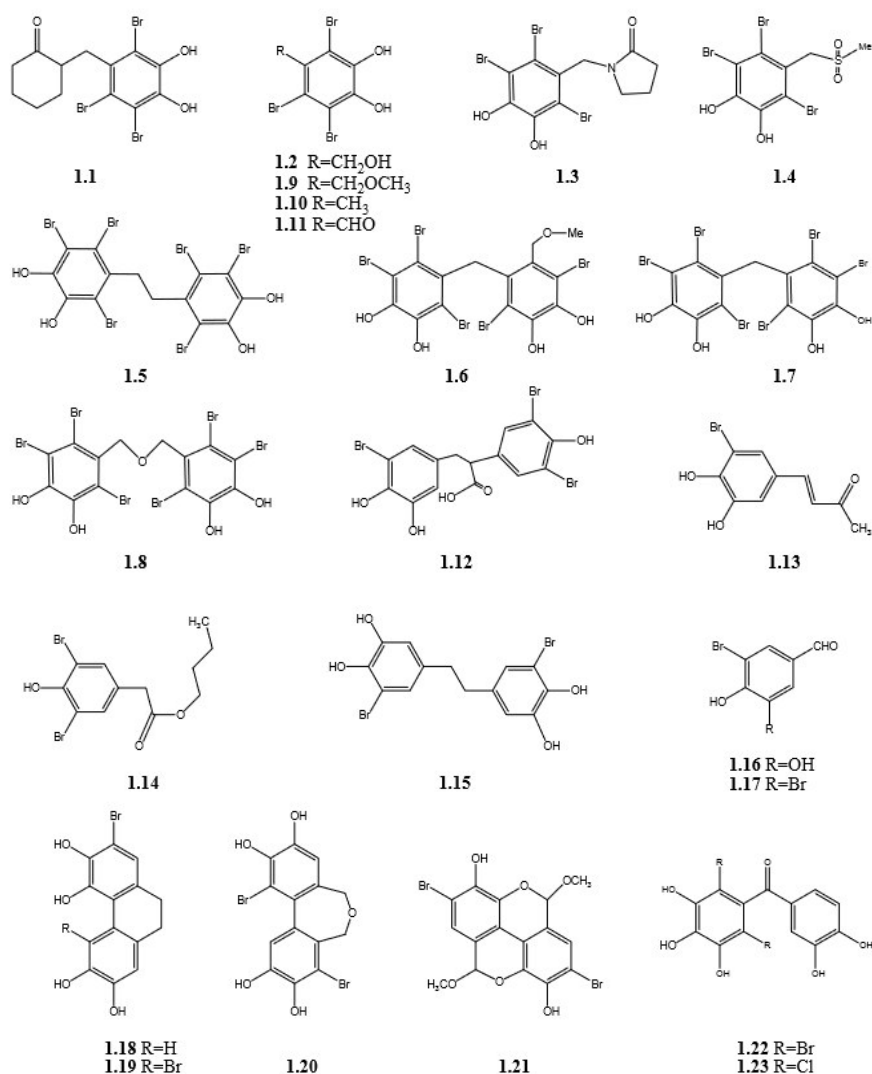


Figura 7. Bromofenoles (BPs) que han demostrado tener actividad antioxidante, BPs 1.1 a 1.11 del alga roja *Symphyocladia latiuscula* y los BPs 1.12 a 1.21 del alga roja *Polysiphonia urceolata* (Liu M. et al., 2011)

Tabla 2. Coeficientes de Inhibición (CI₅₀) de la actividad atrapadora de radicales de los compuestos bromofenólicos de la Figura 7 (Liu M. et al., 2011)

No.	IC ₅₀ (μM)	Nombre de bromofenoles
1.1	8.5	(2R)-2-(2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl)-cyclohexanone [20]
1.2	7.5	2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzylalcohol [20]
1.3	18.5	1-(2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl)pyrrolidin-2-one [21]
1.4	24	2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl sulfone [21]
1.5	10.2	1,2-bis(2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxyphenyl)ethane [21]
1.6	10.5	6-(2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl)-2,5-dibromo-3,4-dihydroxybenzyl methyl ether [21]
1.7	8.1	Bis(2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxyphenyl)methane [21]
1.8	8.5	Bis(2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl)ether [21]
1.9	15.5	2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether [21]
1.10	14.0	2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxymethylbenzene [21]
1.11	24.7	2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzaldehyde [21]
1.12	21.9 ± 0.1	3-(3-bromo-4,5-dihydroxyphenyl)-2-(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl) propionic acid [25]
1.13	9.67 ± 0.04	(E)-4-(3-bromo-4,5-dihydroxyphenyl)-but-3-en-2-one [25]
1.14	16.11 ± 0.06	(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl) acetic acid butyl ester [25]
1.15	19.64 ± 0.09	1,2-bis(3-bromo-4,5-dihydroxyphenyl)ethane [25]
1.16	20.3	3-bromo-4,5-dihydroxybenzaldehyde [26]
1.17	35.8	3,5-dibromo-4-hydroxybenzaldehyde [26]
1.18	6.8	7-bromo-9,10-dihydrophenanthrene-2,3,5,6-tetraol [26]
1.19	6.1	4,7-dibromo-9,10-dihydrophenanthrene-2,3,5,6-tetraol [26]
1.20	8.1	1,8-dibromo-5,7-dihydrodibenzo[c,e]oxepine-2,3,9,10-tetraol [26]
1.21	15.1	Urceolol [26]
1.22	96.2	2,6-dibromo-3,3',4,4',5-pentahydroxydiphenylmethanone [72]
1.23	87.3	2,6-dichloro-3,3',4,4',5-pentahydroxydiphenylmethanone [72]

2.2.3.2.2 Actividad anticancerígena de los compuestos bromofenólicos

La quimioterapia es uno de los principales enfoques terapéuticos para el tratamiento de cáncer, y varias drogas anticancerígenas naturalmente obtenidas, como la camptotecina y taxol, son clínicamente usadas. Se cree que es una estrategia promisorio tamizar compuestos naturales con el fin de descubrir nuevos agentes anticáncer. Diversos estudios reportan que los BPs marinos podrían inhibir la proliferación del número de líneas celulares in vitro y el crecimiento de tumores in vivo. Por ejemplo, BPs derivados aislados del alga parda *Leathesia nana*, (compuestos 2.1-2.6, figura 8), que también comparten la unidad 2,3-dibromo-4,5-dihidroxibencil, son citotóxicos contra una variedad de líneas celulares, incluyendo A549, BGC823, MCF-7,

BEL-7402, HCT-8. El extracto de *Leathesia nana* podría inhibir el crecimiento de sarcoma 180 in vivo y mejorar el sistema inmune marcadamente (Liu M. et al., 2011).

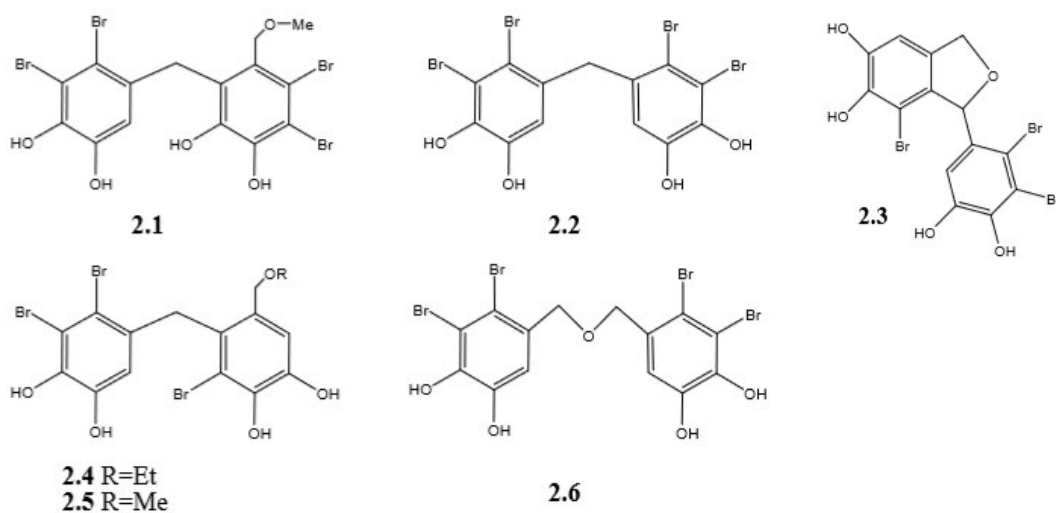


Figura 8. Bromofenoles del alga *Leathesia nana* con actividad anticancerígena (Liu M. et al., 2011).

Han et al. divulgan que cuatro bromofenoles de *Rhodemelia confervoides* muestran actividad anticancerígena contra tumor de célula epitelial humana KB, carcinoma hepatocelular humano Be17402 y células de cáncer de pulmón A549 (Han et al., 2005).

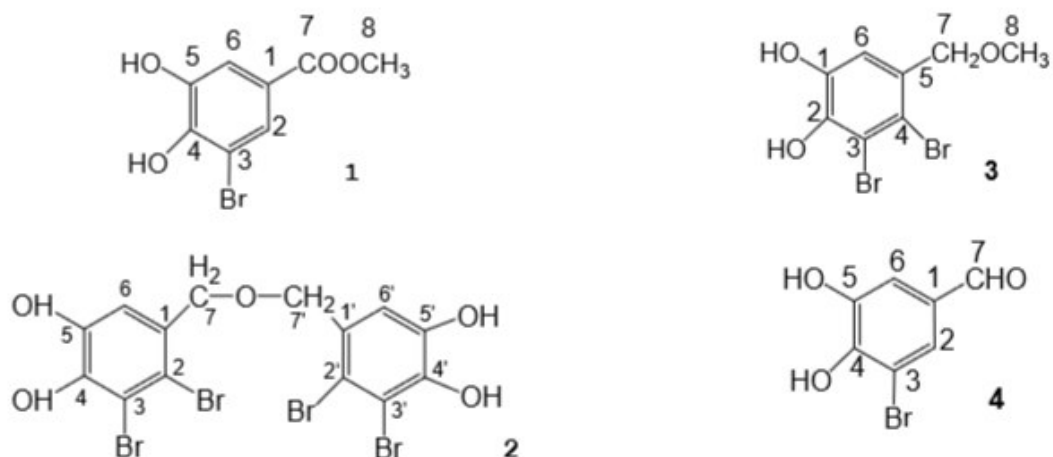


Figura 9. Bromofenoles de *Rhodemelia confervoides* con actividad anticancerígena (Han et al., 2005)

2.2.3.2.3 Actividad antimicrobiana de los compuestos bromofenólicos

Los organismos marinos, como las algas, producen una variedad de compuestos con actividades farmacológicas, incluyendo anticancerígenos, antimicrobianos, antimicóticos, antivirales, antiinflamatorios y otros, y son fuentes potenciales de nuevos agentes terapéuticos. Los organismos marinos sobreviven y viven en comunidades complejas y en estrecha asociación con otros en un ambiente competitivo y hostil. Producen metabolitos secundarios complejos como respuesta a la presión ecológica, como la competencia por el espacio, la depredación y las variaciones de las mareas. Algunos de estos compuestos son antimicrobianos que inhiben o limitan el desarrollo y crecimiento de otros microorganismos competitivos. Entre los compuestos que se encuentran en las macroalgas son metabolitos halogenados, principalmente bromados, como 4-bromo-3-butil-5-(dibromoetilen)-2-(5H)-furanona y 4-bromo-5-(bromometilen)-3-butil-2-(5H)-furanona; del tipo bromoditerpenos, como 12-(S)-hidroxibromoesfaerodiol, bromoesfaerona e isoparguerol y sus derivados; bromofenoles, como bis(2,3-dibromo-4,5-dihidroxibencil)éter, 5-bromo-3,4-dihidroxibenzaldehído y 3,3',5,5'-tetrabromo-2,2',4,4'-tetrahidroxidifenilmetano; y compuestos polares como 2,3-dibromo-4,5-dihidroxifenil-etilamina y 3,4-dihidroxifenil-etilamina (Perez M. et al., 2016).

Bajpai manifiesta que los polifenoles exhiben un rango diverso de potencial antimicrobiano contra bacterias patógenas Gram+ y Gram- con un rango significativo de valores de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de 0.1 a 10 ug/mL. Similarmente se ha confirmado que derivados fenólicos bromados como la sal potásica de 2,3-dibromobenzaldehído y 5-bromo-3,4-dihidroxibenzaldehído aislados de *Polysiphonia lanora* presentan potente efecto antibacteriano (Bajpai, 2016).

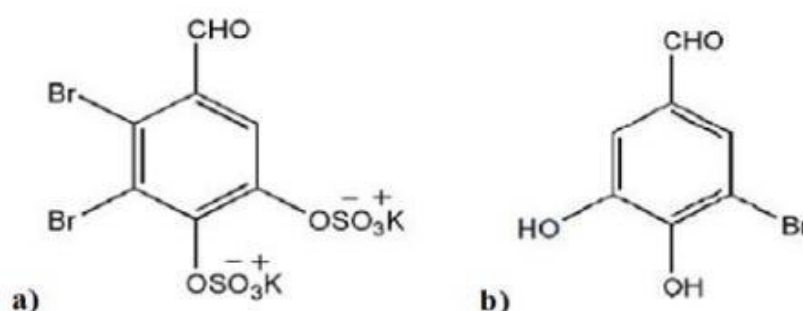


Figura 10. Bromofenoles de *Polysiphonia lanosa* con actividad antibacteriana (Bajpai, 2016)

2.2.3.2.4 Actividad antidiabética de los compuestos bromofenólicos

Las algas marinas se han utilizado durante mucho tiempo como un remedio para la diabetes en la medicina popular. Alrededor del año 2011, los bromofenoles aislados de algas marinas son reportados como agentes antidiabéticos potenciales, actuando como inhibidores de Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) e inhibidores de alfa-glucosidasa. La PTP1B regula la vía de señalización de la insulina y los agentes podrían ser eficaces en el tratamiento de la diabetes. La alfa-glucosidasa es una enzima que juega un papel central en la digestión de los carbohidratos y es una diana preferida para los fármacos antidiabéticos. Los derivados de bromofenol del alga roja *Rhodomela confervoides*, numerados como 4.1 a 4.4, que contienen una o dos unidades de 2,3-dibromo-4,5-dihidroxibencilo y están altamente bromadas, inhiben la actividad de PTP1B (CI50 = 2,4, 1,7, 1,5 y 0,84 μ M, respectivamente) y los extractos de *R. confervoides* podrían disminuir el nivel de glucosa en la sangre en ratas diabéticas. Estos estudios

indican que la actividad antihiper glucémica *in vivo* podría ser parcialmente debida a la inhibición de PTP1B (Liu et al., 2011).

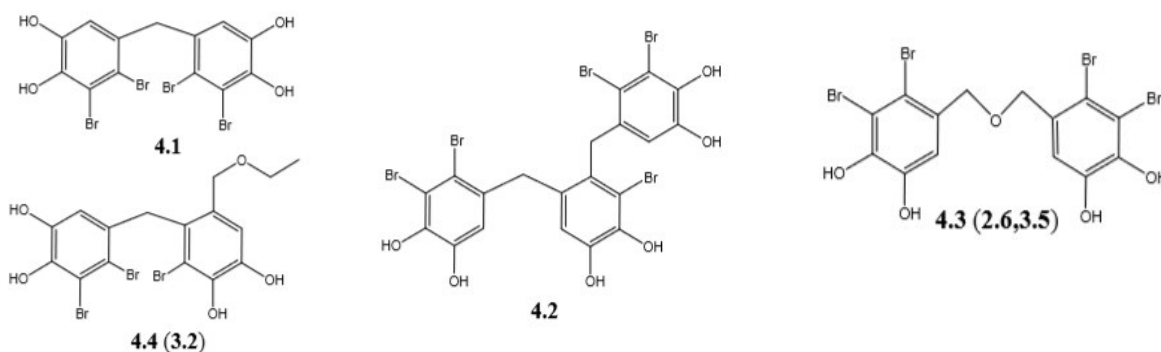


Figura 11. Bromofenoles de *Rhodomela confervoides* con actividad antidiabética (Liu et al., 2011).

2.2.4 La actividad antioxidante

Sabemos que el 21% de nuestra atmósfera es dioxígeno y que prácticamente todo es de origen biológico. El oxígeno atmosférico es producto de la oxidación del agua que lleva a cabo el fotosistema II de las plantas, algas y cianobacterias con la luz solar. También se sabe que la mayoría de los organismos, entre ellos el ser humano, utilizan el oxígeno para respirar y mucho organismos no pueden vivir sin él. Reducen el oxígeno en agua y la energía de esta reacción, que originalmente provino del sol, se utiliza para formar ATP y para transportar iones y metabolitos a través de las membranas celulares. Aproximadamente el 80% del ATP que se utiliza se forma en las mitocondrias (Hansberg W., 2002).

En la naturaleza casi todo es oxidado por el oxígeno: las grasas se vuelven rancias, la goma pierde elasticidad, el papel amarillea, etc. Además estas reacciones de óxido-reducción son muy importantes en bioquímica, puesto que los seres vivos obtienen la mayor parte de su energía libre a partir de ellas: en la fotosíntesis la energía solar impulsa la reducción del CO₂ y la oxidación del agua (H₂O) formando carbohidratos y O₂; y en el metabolismo aeróbico, realizado por los eucariotas y muchos procariotas, tiene lugar un

proceso inverso a la fotosíntesis, que permite almacenar la energía libre producida en la oxidación de los carbohidratos y de otros compuestos orgánicos, en forma de ATP. Pero este oxígeno que es imprescindible para la vida, puede ser también fuente de enfermedad a través de una producción incontrolada de radicales libres de oxígeno (RLO) que dañan las macromoléculas (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) y alteran los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, etc.) (Elejalde J., 2001).

Para contrarrestar el efecto nocivo del O_2 y derivados, la célula cuenta con mecanismos capaces de remover los productos tóxicos del O_2 . Estos mecanismos de defensa son conocidos como sistema antioxidante (AOX), encargado de mantener el equilibrio de las reacciones de óxido reducción y sobrevivencia celular. El sistema antioxidante incluye enzimas, secuestrantes de electrones y nutrientes; todos encargados de eliminar y reducir los efectos de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y los sistemas de defensa AOX; cuando éste se descompensa a favor de las ERO se establece en la célula el estrés oxidativo (EO), considerado componente central de diversas patologías humanas (Sanchez-Valle & Mendez-Sanchez, 2013).

Un radical libre es un átomo o molécula con uno o más electrones no apareados en el último orbital, capaz de reaccionar con múltiples biomoléculas a través de su oxidación. Dentro de este concepto general, las formas reducidas del O_2 se denominan ERO; en las que se incluyen radicales libres y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Halliwell, 2007).

Las ERO son producto del metabolismo celular y fuentes exógenas (rayos X, humo de tabaco, contaminación ambiental); tienen una participación dual en la célula, ya que pueden adoptar un papel benéfico o perjudicial en los sistemas vivos. Los efectos benéficos de las EROS se presentan a bajas concentraciones, participando en diferentes funciones fisiológicas de la célula; como defensa contra agentes infecciosos y sistemas de señalización

celular (mitosis). En contraparte el efecto dañino de los radicales libres en los sistemas biológicos produce EO generado por la deficiencia de antioxidantes e incremento de las EROS (Sanchez-Valle & Mendez-Sanchez, 2013).

2.2.4.1 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Las especies reactivas de oxígeno (denominadas también ROS, Reactive Oxygen Species) son compuestos que se derivan de la molécula de oxígeno (O_2) por reducción química parcial. En este grupo se incluyen a los peróxidos de hidrógeno (H_2O_2), producidos cuando el oxígeno es reducido con dos electrones y las formas reactivas de oxígeno que abarcan a los superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) y al radical hidroxilo (HO^{\bullet}). Sin embargo, en un sentido más amplio, existen otras especies como el radical alcohoxilo, el radical peroxilo, el dióxido de nitrógeno, el hidroperóxido lípido (LOOH), el hidroperóxido proteína e hipoclorito (Baizabal C., 2010).

Tabla 3. Ejemplos de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (Galvan et al., 2008)

Radical	Nombre	Moléculas diana
$O_2^{\bullet-}$	Superóxido	Enzimas
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno	Ácidos grasos insaturados
OH^{\bullet}	Hidroxilo	Todas las moléculas
R	R-ilo	Ácidos grasos insaturados
RO	R-oxilo	Ácidos grasos insaturados
ROO	R-dioxilo (peroxilo)	Ácidos grasos insaturados
ROOH	Hidroperóxido	Ácidos grasos insaturados
O	Singlete de oxígeno	Distintas moléculas
NO	Nitroxilo	Distintas moléculas
CCl	Triclorometileno	Oxígeno

2.2.4.2 Sistema antioxidante celular

Para contrarrestar el efecto nocivo de los radicales libres, los organismos aerobios cuentan con sistemas de defensa antioxidante, que incluyen moléculas, enzimas y secuestradores químicos que previenen el daño oxidativo. Las enzimas del sistema antioxidante (AOX) son la primera línea

de defensa celular frente al daño oxidativo las cuales eliminan el ($O_2^{\bullet-}$) y el H_2O_2 . Una segunda línea de defensa está compuesta por moléculas no enzimáticas que actúan sobre los radicales libres (Sanchez-Valle & Mendez-Sanchez, 2013).

Los antioxidantes se pueden agrupar según su naturaleza química y su modo de acción:

- Enzimas, actúan específicamente sobre las ERO, degradándolas a moléculas menos nocivas mediante mecanismos bioquímicos específicos. El proceso inicia con la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD); posteriormente, la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) actúan convirtiendo el H_2O_2 en H_2O . La actividad de estas enzimas debe estar en equilibrio para mantener el equilibrio REDOX intracelular.
- Antioxidantes preventivos, son moléculas encargadas de secuestrar a los iniciadores del proceso oxidativo, tales como Fe y Cu, los cuales aceleran la formación de ERO. Estas moléculas son las glicoproteínas que se unen al Fe transportándolo en el torrente sanguíneo por medio de la transferrina y lactoferrina, para ser almacenado intracelularmente por la ferritina. Unido a esto, la ceruloplasmina atrapa a los iones de Cu^+ impidiendo la formación de radicales libres a partir de peróxidos. En el plasma el Cu^+ no unido a la ceruloplasmina está ligado a la albúmina, aunque ésta no previene su interacción con H_2O_2 para formar el radical hidroxilo.
- Antioxidantes secuestradores de ERO, inhiben la cadena de reacción y propagación en la formación de radicales libres. El ácido úrico es un producto del metabolismo de las purinas, capaz de atrapar radicales peroxilo, alcóxilo, ERO e iones de Cu^+ y Fe^+ . La biliburrina es un producto secundario del metabolismo del grupo hemo (grupo prostético con Fe^+ , capaz de unir átomos de O_2), con actividad antioxidante que inhibe la peroxidación lipídica en los sistemas celulares.
- Antioxidantes nutricionales. Para proteger a la célula en contra de los efectos de la oxidación, los sistemas de defensa antioxidante deben

actuar en conjunto para formar un sistema íntegro en donde la dieta es la mayor fuente de antioxidantes y micro elementos para la síntesis de enzimas antioxidantes. En este sentido, varios metales (Cu, Zn, Se, Mn y Fe) participan como componentes o cofactores de enzimas AOX; al igual que las vitaminas, ácido ascórbico, alfa-tocoferol, beta-tocoferol y ácido fólico, las cuales actúan como atrapadores de las EROS (Fusco et al., 2007; Bonnefoy et al., 2013).

2.2.4.3 Estrés oxidativo, procesos degenerativos y enfermedad

Las ERO y el establecimiento de EO afectan a una amplia variedad de funciones fisiológicas y participan en el desarrollo de enfermedades humanas de tipo crónico-degenerativas con impacto epidemiológico

Estas en enfermedades pueden clasificarse en las generadas por pro-oxidantes que modifican el estado redox y alteran la tolerancia a la glucosa, favoreciendo el EO mitocondrial en enfermedades como el cáncer y la diabetes mellitus; el segundo grupo incluye EO de tipo inflamatorio y una mayor actividad de la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH-ox) que conducen a la aterosclerosis e inflamación crónica; y el tercer grupo deriva del sistema xantina-oxidasa, generando ERO implicados en la lesión isquémica por reperfusión. Por otra parte, el proceso de envejecimiento está ligado al efecto dañino de los radicales libres a través de la oxidación de biomoléculas como lípidos, ADN y proteínas, repercutiendo directamente en el proceso de envejecimiento. Los procesos patológicos implicados con el EO son diversos, así tenemos el envejecimiento, la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, carcinogénesis, enfermedad cardiovascular, enfermedades hepáticas, y diabetes mellitus (Sanchez-Valle & Mendez-Sanchez, 2013).

También promueven la permeabilidad vascular y activan a una gran cantidad de sustancias que atraen neutrófilos, lo que desencadena la infiltración por los mismos en el músculo esquelético, originando una respuesta inflamatoria

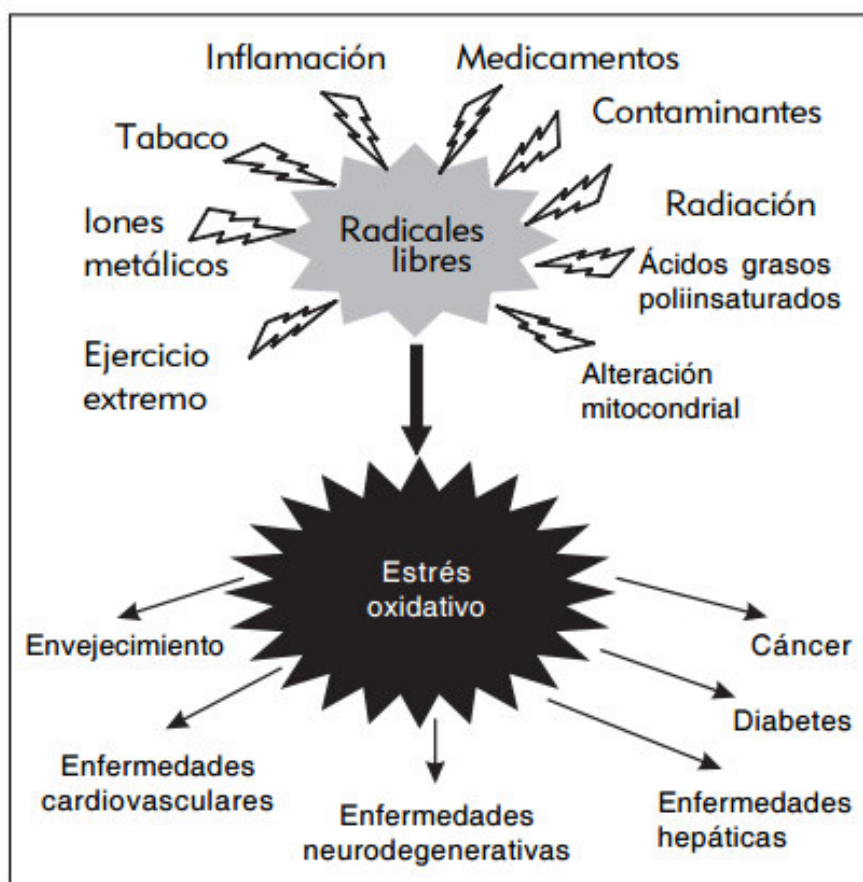


Figura 12. Esquema de la generación exógena de radicales libres y efectos adversos del estrés oxidativo en la patogénesis de enfermedades (Sanchez-Valle & Mendez-Sanchez, 2013).

2.2.4.4 Antioxidantes

Papas (1999) define a los antioxidantes como cualquier sustancia que, cuando está presente a bajas concentraciones en comparación a las de un sustrato oxidable (por ejemplo, lípidos, proteínas y ADN), retrasa o previene significativamente la oxidación de dichos sustratos. Así, los antioxidantes minimizan el daño oxidativo en sistemas biológicos, previniendo la formación de EROs o por quelación de las EROs antes de que éstas puedan reaccionar con otras biomoléculas. Los antioxidantes pueden ser compuestos endógenos producidos por el organismo como parte de su defensa de las EROs o compuestos exógenos adquiridos de la dieta (Baizabal, 2010).

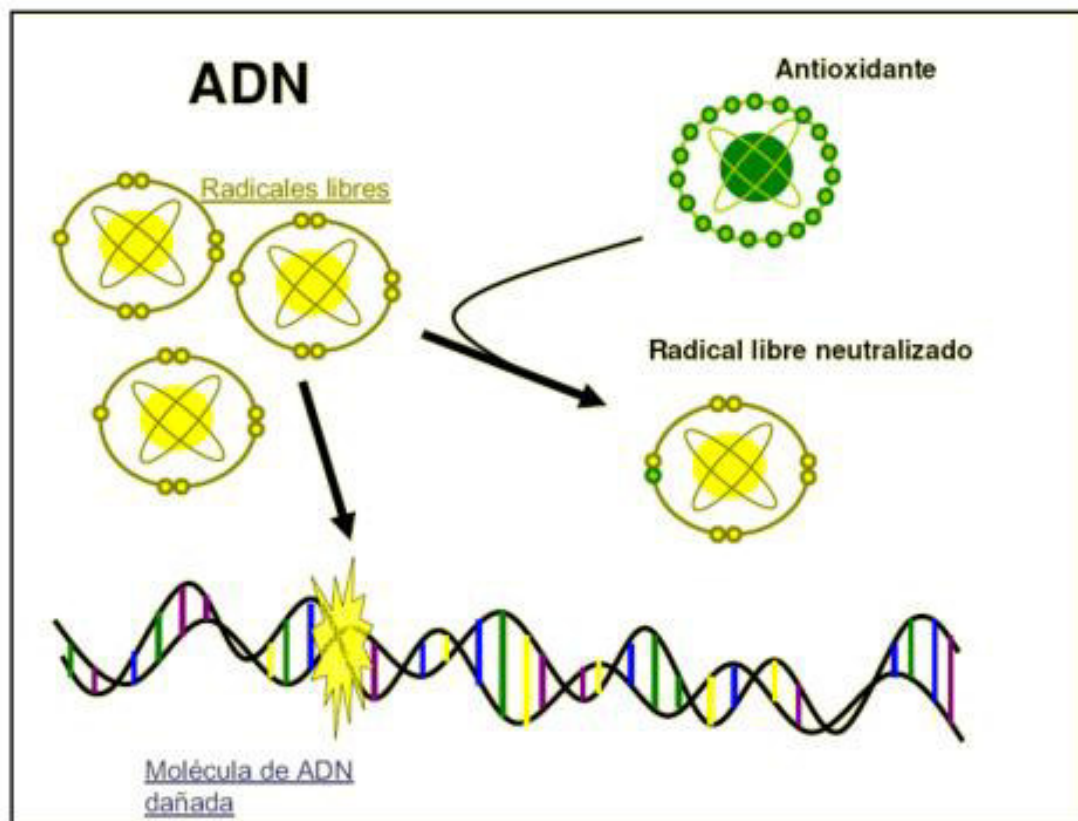


Figura 13. Radical libre neutralizado por un antioxidante (Baizabal, 2010).

2.2.4.5 Antioxidantes en algas marinas

La literatura científica indica que las algas marinas son fuente de sustancias con estructuras novedosas y diferentes actividades biológicas como la actividad antioxidante. La revisión bibliográfica demostró que las algas verdes, pardas y rojas, son ricas en compuestos terpenoides, especialmente de tipo sesquiterpeno y diterpeno, y además muchos de estos terpenos contienen grupos fenólicos halogenados con actividad antioxidante (Echevarria et al., 2009).

Las algas marinas son excelentes candidatos como fuente de metabolitos con actividad antioxidante, porque han desarrollado fuertes sistemas antioxidantes en respuesta a las condiciones altamente oxidativas en que viven. Como organismos fotosintéticos, las algas marinas están expuestas a una combinación de luz y altas concentraciones de oxígeno, que permiten la formación de radicales libres y otros agentes oxidantes fuertes (Dutra et al., 2007).

La ausencia de daños oxidativos sobre los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, de sus siglas en inglés) estructurales de las membranas tilacoidales (a pesar de la proximidad del oxígeno producido durante la fotosíntesis) sugiere que las células de las algas marinas han desarrollado potentes mecanismos de protección (Namiki, 1990).

A modo de ejemplo se pueden citar la acumulación de compuestos que absorben radiaciones ultravioleta (UV), como los aminoácidos tipo micosporinas presentes en las algas rojas *Callithamnion gaudichaudii* C. Agardh y *Ceramium* Roth spp., los que pudieran estar involucrados en la adaptación de estas algas a los elevados niveles de radiaciones a que son sometidas (Rozema et al., 2002).

Muchos autores han comprobado que los extractos de algas marinas presentan actividad antioxidante explicada por varios mecanismos de acción; entre estos se encuentran la capacidad atrapadora de radicales libres, la quelación de metales pro-oxidantes, los mecanismos de donación y aceptación de electrones y la capacidad de interrupción de la peroxidación lipídica. Adicionalmente se ha comprobado que extractos de vegetales, con compuestos químicos también presentes en las algas, son capaces de inducir enzimas relacionadas con la inactivación de especies reactivas del oxígeno (ERO) (Matsukawa et al., 1997).

La actividad antioxidante de las algas marinas, puede ser explicada por la presencia de diferentes compuestos químicos. Las algas marinas pueden tener compuestos apolares, como los derivados clorofílicos, terpenoides y carotenoides. Algunas especies de algas (y otros organismos marinos) tienen aminoácidos tipo micosporinas, capaces de absorber cantidades apreciables de radiaciones UV y evitar así el daño peroxidativo (Hader et al., 2004).

El contenido de vitaminas liposolubles como la vitamina E e hidrosolubles como la vitamina C, compuestos que presentan actividad antioxidante,

también pudieran contribuir a las propiedades antioxidantes de estos organismos. Entre los compuestos polares (aunque algunos de ellos son apolares) se encuentran los compuestos polifenólicos como los flavonoides y ácidos fenólicos y cinámicos, por citar algunos ejemplos. Los polifenoles constituyen uno de los más numerosos y representativos grupos de metabolitos secundarios de las plantas; su relevancia radica en su participación en diferentes eventos vegetales tanto fisiológicos como metabólicos. Estos compuestos están presentes en la mayoría de los productos vegetales consumidos por el hombre, y su potencial beneficioso para la salud humana se evidencia por la significativa actividad antioxidante que presentan (Batista et al., 2009).

Las algas tienen como rasgo distintivo con respecto a las plantas terrestres, que presentan compuestos polisacáridos y compuestos simples sulfatados, así como florotaninos y bromofenoles, algunos de ellos con actividad antioxidante. Adicionalmente contienen metales como Se, Zn, Mn y Cu que aunque per se no son antioxidantes, al ser componentes fundamentales de enzimas antioxidantes también pudieran contribuir a sus propiedades antioxidantes al ser consumidos por el hombre (Shick y Dunlap, 2002).

CAPITULO 3: METODOLOGÍA

Los ensayos se realizaron por triplicado en los Laboratorios del Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

La determinación de bromo por ICP-MS fue realizado por Laboratorios Bluffsfein, se realizó en una sola muestra.

Los espectros infrarrojos fueron realizados en los laboratorios de Ingeniería Química de la Universidad de Ingeniería y Tecnología (UTEC), se realizó en una sola muestra.

3.1. Tipo y diseño de estudio

El presente estudio es de tipo experimental y descriptivo. Es experimental porque se tiene en cuenta la relación causal de las variables:

Variable Independiente: Alga *Polysiphonia paniculata*

Variables dependientes: - Producción de bromofenoles
- Zonas de recolección

3.2. Recolección del material biológico

Las algas de la especie *Polisyphonia paniculata* Montagne fueron recolectadas en tres zonas del litoral peruano en Febrero del año 2017:

- Playa “Barranco”, distrito de Barranco, departamento de Lima (B)
- Playa “Punta Rocas”, distrito de Pisco, departamento de Ica (PS)
- Playa “Lagunillas”, distrito de Paracas, departamento de Ica (PA)

Los mapas de ubicación de las zonas de recolección se visualizan en el anexo I.

Se recolectaron aleatoriamente considerando los siguientes criterios de selección:

- Fases tetraspórica y gametofítica
- Color rojo vinoso
- Longitud: aproximadamente 10 a 15 cm
- Sin tejido en descomposición.

Las muestras algales recolectadas fueron limpiadas manualmente para eliminar arena, epifitos y fauna acompañante, luego se lavaron con agua potable y se enjuagaron con agua destilada.

3.3. Identificación del material

La identificación y clasificación taxonómica de la especie fue realizada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, donde fue identificada como *Polysiphonia paniculata* Montagne “Polisifonia” (Anexo II).

3.4. Desecado, molienda y almacenaje

Las muestras algales se secaron durante 48 horas bajo luz artificial a aproximadamente 25°C y finalmente durante 48 horas en estufa a 40 °C.

Las algas secas fueron molidas hasta obtener un polvo fino y se guardaron en envases de vidrio herméticamente cerrados y en lugar fresco.

3.5. Preparación de los extractos

El proceso de extracción secuencial se realizó mediante maceración en tres tipos de solventes, dejando macerar 50 g de alga (seca y molida) en 500 mL de solvente durante 7 días con agitación eventual.

Los solventes empleados fueron éter de petróleo, diclorometano y etanol 96°, los que se emplearon en orden creciente de polaridad. Los extractos obtenidos fueron filtrados usando papel Whatman No. 1, los sobrenadantes fueron evaporados en un rotavapor rotatorio y los extractos secos resultantes fueron conservados en frasco ámbar y refrigerados.

3.6. Materiales de laboratorio

- Embudo, papel de filtro Whatman No. 1, beakers, pipetas graduadas, pipetas pasteur, tubos de prueba, gradillas, guantes de goma, mascarilla,

parafilm, viales de vidrio, pera de separación, placas cromatográficas con Silicagel F254, micropipetas y fiolas.

3.7. Equipos de laboratorio

- Rotavapor rotatorio Marca Buchi
- Estufa Marca Memmert
- Balanza analítica Marca Sartorius
- Espectrofotómetro UV-VIS Marca Genesis 6
- Cabina de visualización, con lámparas UV a 254nm. y 365 nm. Marca Chromato-Vue
- Espectrofotómetro infrarrojo por transformada de Fourier FTIR-Marca Shimadzu. Modelo IRTracer-100
- Espectrómetro de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) Marca Perkin Elmer. Modelo NexION 300D

3.8. Reactivos

- Solventes: éter de petróleo, diclorometano, etanol 96^o, cloroformo, dimetilsulfóxido, metanol, butanol y benceno
- Reactivo 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) (Marca Calbiochem)
- Reactivo Folin-Ciocalteu (Marca Sigma-Aldrich)
- Agua bidestilada
- Vitamina C (Marca Scharlau)
- Ácido gálico (Marca Riedel-de Haen)
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Fluoresceína
- Solución fosfomolibdica en etanol al 2%

3.9. Tamizaje fitoquímico

Los extractos etéreo, diclorometánico y etanólico de cada zona geográfica sirvieron para verificar la presencia de metabolitos secundarios mediante reactivos generales y específicos (Look, 1994).

3.10. Determinación de la cantidad de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu

Fundamento: Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (RFC), que mide la capacidad de reducir el ácido fosfomolibdico/fosfotungstico, en el cual, el molibdeno se encuentra en estado de oxidación VI, de color amarillo, que al ser reducido en un medio básico por los compuestos fenólicos, da un complejo de color azul intenso, cambiando el estado de oxidación del metal de VI a V; susceptible de una determinación espectrofotométrica a 720nm. (Yildiz G. et al, 2011)

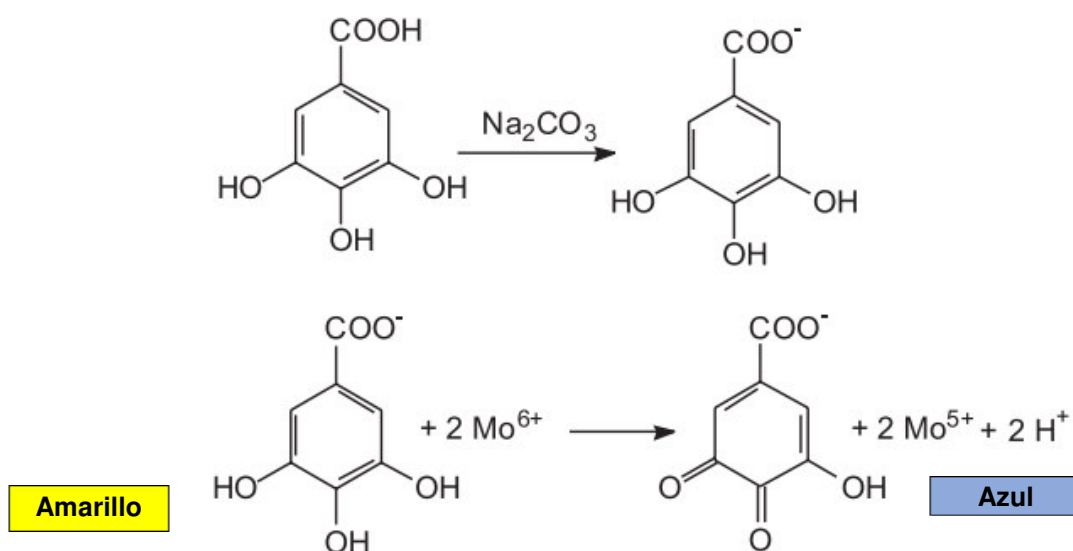


Figura 14. Esquema de reacción del ácido gálico con molibdeno (VI), componente del reactivo Folin-Ciocalteu (Cabral de Oliveira et al., 2009)

Procedimiento:

Los contenidos fenólicos totales de los extractos etéreo, diclorometánico y etanólico se midieron usando el método de Folin-Ciocalteu descrito por (Yildiz et al., 2011)

Se realizó una curva de calibración de ácido gálico con las siguientes concentraciones: 2,5; 5,0; 7,5; 10 y 25 $\mu\text{g/mL}$ diluidas en agua destilada.

Se mezclaron 100 μL de alícuota de muestra con 2 mL de Na_2CO_3 al 2% y se dejó reposar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Después se añadieron 100 μL de reactivo Folin Ciocalteu, y se mezcló bien, se dejó

reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se midieron las absorbancias a 720 nm. y el contenido fenólico total se calculó con el estándar de ácido gálico, expresado como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (Yildiz G. et al, 2011)

Se prepararon las siguientes soluciones de cada extracto de muestra:

Tabla 4. Concentraciones de extractos (mg/mL) utilizados en la determinación de contenido de fenoles totales

Alga/procedencia	Extracto Etéreo	Extracto DCM	Extracto Etanólico
	Soluciones de muestras en mg/mL		
Barranco	16	5	5
Pisco	12.7	5	5
Paracas	10	5	5

Las concentraciones de las muestra en [ug/mL] se obtiene mediante la curva de calibración de ácido gálico.

La fórmula para obtener el contenido de Fenoles totales expresado en mg equivalentes a Acido gálico/gramo de extracto seco es:

$$\frac{\text{mg EAG}}{\text{g de extracto seco}} = \frac{\left[\text{muestra} \frac{\text{ug}}{\text{mL}} \right] \times 10}{\text{Fd} \times 100} \quad \text{Fd} = \text{Factor de dilución}$$

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{mg de extracto}}{10} \times 0.1$$

3.11. Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

Fundamento:

El radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocido como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la

molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno como se muestra en la figura 15, el color violeta se desvanece.

Los resultados del ensayo DPPH se expresan como Coeficiente de inhibición₅₀ (CI₅₀), definido como la cantidad de antioxidante necesaria para neutralizar el 50% de la concentración inicial de DPPH (Tovar J., 2013).

Este método es considerado, desde el punto de vista metodológico, uno de los más fáciles, precisos y reproducibles de la actividad antioxidante de jugos de frutas, extractos vegetales y sustancias puras (Alves et al., 2010).

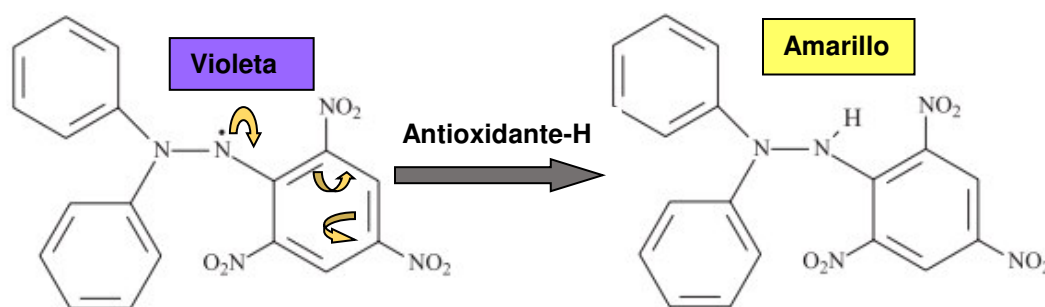


Figura 15. El radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) (color violeta) se reduce en la 1,1-difenil-2-picril-hidrazina (color amarillo) por la acción antioxidante de compuestos que contienen grupos –OH que decoloran dicho reactivo. El radical libre es de larga vida debido a la presencia de los enlaces π de los anillos aromáticos (Alves et al., 2010)

La fórmula para obtener los porcentajes de la actividad captadora de radicales libres es la siguiente:

$$\% \text{CAPTACIÓN RADICAL LIBRE} = \left(1 - \left[\frac{\text{Abs MP} - \text{Abs B/M}}{\text{Abs DPPH}} \right] \right) \times 100\%$$

La CI_{50} se determinó a partir de la gráfica del porcentaje de inhibición en función de la concentración.

Procedimiento:**Preparación del Reactivo DPPH:**

Solución Stock DPPH: solución metanólica de DPPH al 0.2%, se prepara disolviendo 2mg del Reactivo DPPH en una fiola ámbar de 100mL y se lleva a volumen con metanol.

A partir de esta solución de DPPH se preparó el patrón de referencia de DPPH mezclando 0.8mL de solución con 1.6 mL de metanol.

Muestra problema:

Preparación de la muestra: En un tubo falcón de 15mL se pesó una cantidad de extracto seco y se enrazó a 10mL con metanol. Esta solución es la solución madre a partir de la cual se prepararon diluciones en volumen final de 4mL.

Luego 0.8mL de cada dilución preparada se mezcló con 1.6 mL de la solución de DPPH al 0.2%, se dejó en reposo en la oscuridad por 30 minutos, se midieron las absorbancias en el espectrofotómetro a 517 nm. para determinar la actividad antioxidante.

Cada extracto de éter, diclorometano y etanol se preparó y ensayó por triplicado.

Asimismo, se preparó un blanco de muestra para cada concentración.

Estándar de vitamina C:

Se prepararon las concentraciones de trabajo 2.5µg/mL, 5.0µg/mL, 7.5µg/mL y 10.0µg/mL.

Tabla 5. Concentraciones de extractos utilizados en la determinación de la actividad antioxidante. B=Barranco, PS=Pisco, PA=Paracas

CONCENTRACIONES DE LOS EXTRACTOS (µg/mL) PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE								
ÉTER			DICLOROMETANO			ETANOL		
B	PS	PA	B	PS	PA	B	PS	PA
400	508	250	144	200	75	500	75	750
1600	1270	2250	297	300	150	1500	150	1000
2400	1778	2500	585	500	225	2000	300	1500
3200	3302	3000	864	600	600	2500	750	2000
4800	4826	3750	1170		750	3500	1200	2500
			1485				1500	

3.12 Caracterización estructural del metabolito bromofenólico con actividad antioxidante

3.12.1 Identificación de grupo fenólico

3.12.1.1 Mediante cromatografía en capa fina

Identificación de grupos fenólicos mediante CCF. La cromatografía de fenoles ha sido estudiada ampliamente. Muchas técnicas han sido desarrolladas para establecer sistemas de fase móvil y reveladores para detectar las manchas. Entre ellas tenemos la fase móvil butanol: benceno: agua (1:19:20) v/v y el revelador utilizado para localizar fenoles es el ácido fosfomolíbdico al 2% (Gumprech, 1965).

Fase estacionaria: placa de Silicagel G60 F254

Fase móvil: Butanol:Benceno:Agua 1:19:20 v/v

Revelador: Solución fosfomolíbdica 2%

(Gumprech, 1965; Lenis, 2007)

3.12.1.2 Mediante análisis espectrofotométrico UV-VIS

La espectroscopía de absorción UV-VIS se basa en la medida de la atenuación del haz de luz después de pasar a través de una muestra. La medida de absorción puede ser a una longitud de onda simple o un rango

espectral. Los espectros de absorción UV-VIS tienen utilidad desde el punto de vista cualitativo, ya que se pueden relacionar las longitudes de onda de la radiación absorbida con el tipo de enlace presente en las moléculas. Sin embargo, resultan especialmente útiles en análisis cuantitativo. Según la ley de Lambert-Beer la absorbancia está relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente y con el camino óptico (Mauri et al, 2010).

Según lo expuesto, la fracción 4 del extracto diclorometánico del alga recolectada en Paracas, obtenida por cromatografía en capa fina, fue analizada por espectrofotometría UV-VIS.

3.12.1.3 Mediante análisis espectrofotométrico infrarrojo

Un espectro de IR se obtiene al pasar radiación de infrarrojo a través de una muestra y determinar que fracción de esa radiación incidente ha sido absorbida. La interacción de la radiación infrarroja con la materia provoca en ésta una alteración que guarda relación con cambios en el estado de vibración de las moléculas afectadas. Se obtiene un espectro vibracional donde los picos de las bandas del espectro se relacionan con la frecuencia de vibración, su longitud de onda o el inverso de su longitud de onda llamado número de onda, de una parte de la molécula afectada. El espectro vibracional de una molécula se considera que es una propiedad característica de ese tipo de molécula y sirve para identificar la sustancia o compuesto químico que contiene ese tipo de moléculas. Por tanto, cada compuesto químico tiene asociado un espectro infrarrojo característico, que se debe a cambios de los estados de energía vibratoria de las moléculas, donde los máximos de absorción corresponden a determinadas energías de vibración (tensión, flexión o deformación) de los enlaces químicos presentes (Beyer, 1987).

De acuerdo a lo mencionado, los extractos diclorometánicos de las tres zonas de recolección fueron analizadas por espectrofotometría infrarroja, este ensayo fue realizado en los laboratorios de Ingeniería Química de la Universidad de Ingeniería y Tecnología (UTEC).

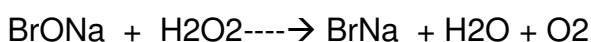
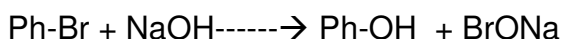
3.12.2 Identificación de bromo

3.12.2.1 Mediante reacciones químicas cromogénicas

a) Detección de bromo por la fluoresceína tras la producción oxidativa de bromo (Feigl, 1978).

Fundamento:

Cuando los compuestos halogenados se calientan con el reactivo ácido cromosulfúrico ocurre una combustión húmeda y se libera el halógeno. Los vapores de bromo producidos de esta manera pueden ser detectados por la prueba de fluoresceína (conversión de la fluoresceína amarilla en eosina roja).



Procedimiento:

Unos 20mg de extracto se trató con varias gotas de ácido cromosulfúrico* en un tubo de vidrio. El extremo abierto del tubo de vidrio se cubrió con un disco de papel de filtro humedecido con hidróxido de sodio 2N. El tubo de ensayo se mantuvo durante 5 minutos en agua hirviendo. El disco de papel reactivo se colocó sobre una placa de vidrio, mojado con varias gotas de solución de ácido permolibdico** y después se secó con aire frío. Apareció una mancha parda que se trató con una gota de solución alcohólica de fluoresceína al 0.1%, ante la presencia de bromo se desarrolló una mancha roja.

*Reactivo cromo-sulfúrico: solución saturada de bicromato de potasio en ácido sulfúrico concentrado.

**Solución de ácido permolibdico: 5mL de peróxido de hidrógeno al 30% y 5 mL de ácido acético concentrado más 2 o 3 gotas de molibdato amónico 0.5M.

3.12.2.2 Mediante Técnicas espectroscópicas:

a) **Análisis espectrofotométrico infrarrojo**

Se obtuvieron los espectros infrarrojos de los extractos DCM de las tres zonas de recolección.

b) **Espectrometría de masa con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)**

La espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, del nombre en inglés Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), es una variante de las técnicas de análisis por espectrometría de masas. Las ventajas de esta técnica es la alta precisión, bajos límites de detección analizando la mayoría de los elementos e isótopos presentes en la tabla periódica de manera simultánea o secuencial. La utilización del laser acoplado al ICP-MS, permite el análisis de elementos traza y tierras raras en minerales, fósiles, metales, semiconductores, etc. (nanogramo/litro o parte por trillón, ppt).

La técnica de ICP-MS combina dos propiedades analíticas que la convierten en un potente instrumento en el campo del análisis multielemental **de** elementos traza. Obtiene también una matriz libre de interferencias debido a la eficiencia de ionización del plasma de Ar y por otra parte presenta una alta relación señal-ruido característica en las técnicas de espectrometría de masas. El plasma de acoplamiento inductivo de argón es usado como una fuente muy eficaz de iones en su estado M^+ . El espectro de masas de esta fuente de iones es medido por medio de un espectrómetro de masas cuadrupolar. Esto es posible mediante una zona de interface capaz de introducir los iones del plasma a través de un orificio (Cono muestreador) por medio de una unidad de vacío diferencial (Skimmer) y posteriormente dentro del filtro cuadrupolar de masa (Sampayo, 2011)

Fundamento:

Se basa en el acoplamiento de un método para generar iones (plasma acoplado inductivamente) y un método para separar y detectar los iones (espectrómetro de masas).

La muestra, en forma líquida, es transportada por medio de una bomba peristáltica hasta el sistema nebulizador donde es transformada en aerosol gracias a la acción de gas argón. Dicho aerosol es conducido a la zona de ionización que consiste en un plasma (plasma: volumen de gas con parte de sus átomos o moléculas ionizados) generado al someter un flujo de gas argón a la acción de un campo magnético oscilante inducido por una corriente de alta frecuencia. En el interior del plasma se pueden llegar a alcanzar temperaturas de hasta 7700 °C. En estas condiciones, los átomos presentes en la muestra son ionizados. Los iones pasan al interior del filtro cuadrupolar a través de una interfase de vacío creciente, allí son separados según su relación carga/masa. Cada una de las masas sintonizadas llega al detector multiplicador de electrones y son cuantificados. Los resultados se reportan en cuentas por segundo (cps).

Las cuentas obtenidas para un ión concreto se comparan con la recta de calibración para obtener la concentración del elemento en la muestra. El uso de un estándar interno compensa las interferencias físicas como tensión superficial, viscosidad y efecto de carga en el proceso de transporte de la muestra al plasma y la transferencia de iones al espectrómetro de masas.

El ICP-MS proporciona información multielemental en una gran variedad de muestras.

La determinación de halógenos por este método presenta las ventajas de elevada sensibilidad, selectividad, capacidad multielemental y rapidez de análisis (Foster et al., 2014).

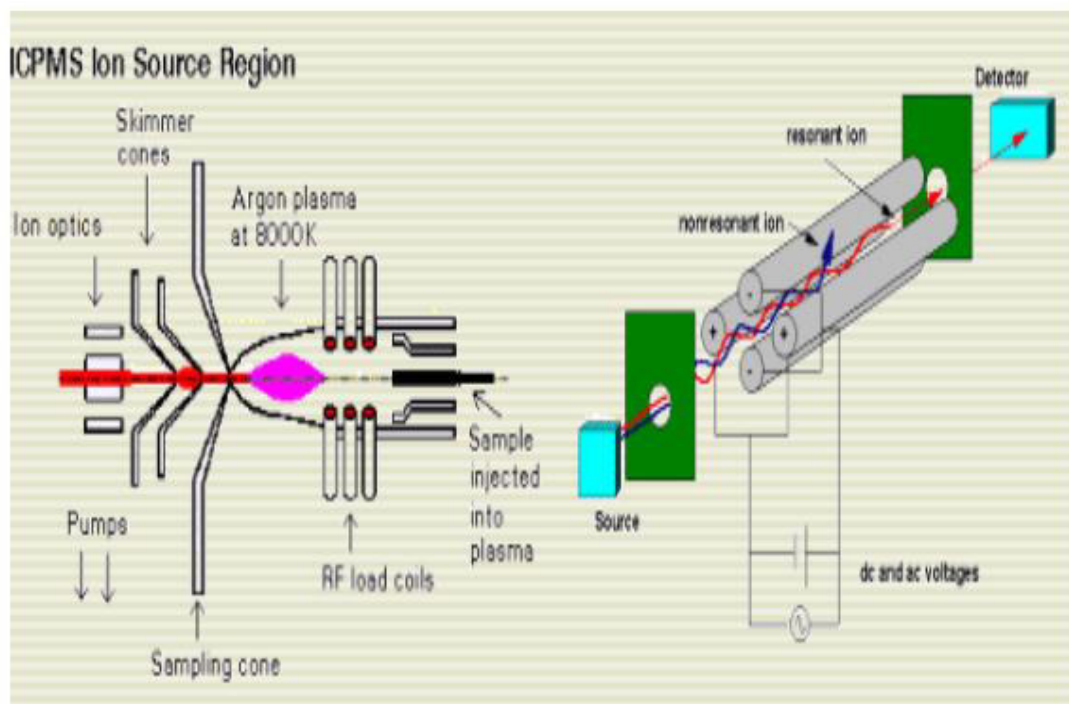


Figura 16. Esquema del sistema de ionización por plasma (ICP) y el analizador cuadrupolar (MS) (Sampayo, 2011)

Procedimiento:

La determinación de bromo se fundamenta en la cuantificación de las intensidades de señal de los aniones de bromo luego de ser ionizados en el plasma

Es un método adaptado del método de Foster M. et al., 2014.

Solución estándar: Bromuro de potasio.

Se prepara la curva de calibración con las concentraciones: 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 y 250ppb, diluyente agua.

Solución estándar interno: se prepara rodio 5ppb en agua

Solución muestra

Preparación de la solución muestra:

Desintegración de la materia orgánica: Cada uno de los extractos secos de DCM de las tres zonas de recolección, fueron digestados con HNO_3 y H_2O_2 , para lo cual se pesó 100mg de muestra y se le adicionó 4mL de HNO_3 y 2mL de H_2O_2 .

Se digestó por microondas a 50°C y 60 bar de presión por 30 minutos. Una vez digestada se diluye a 100mL con agua purificada. (Nguyen, 2014)

Blanco de muestra: Solución de HNO_3 al 4% y H_2O_2 al 2%

Solución carrier: Solución 1% HNO_3

Solución de lavado: Solución 0.1% HNO_3

3.12.3 Aislamiento de fracciones por cromatografía preparativa en capa delgada

El extracto de diclorometano del alga recolectada en Paracas, mostró 5 bandas principales, enumeradas como fracciones 1, 2, 3, 4 y 5 en el cromatograma desarrollado en un cromatoplaque de Silicagel G60 de 20 por 20 cms., y con el sistema de solventes: n-butanol:benceno:agua 1:19:20 v/v.

La fracción 4 fue eluída con diclorometano, filtrado en papel de filtro whatman No. 1. El eluato se dejó en reposo al medio ambiente dando como resultado un producto cristalizado el cual fue guardado en un frasco de vidrio con tapa. La fracción 4 fue elucidada mediante espectroscopia UV-VIS y sus constantes físicas (punto de fusión).

También se obtuvieron los espectros UV-VIS de las fracciones 1, 2, 3 y 5, pero dichas fracciones no cristalizaron.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis e interpretación de resultados

4.1.1 Tamizaje fitoquímico

Los resultados del estudio fitoquímico demostró que los extractos etéreos contienen compuestos fenólicos, taninos y terpenos.

Los extractos diclorometánicos contienen compuestos fenólicos, isoflavonas (excepto el extracto de Pisco), así como esteroides y alcaloides.

Los extractos etanólicos contienen compuestos fenólicos, isoflavonas, alcaloides, taninos y terpenos, así como carbohidratos, azúcares reductores y aminoácidos.

Tabla 6. Marcha fitoquímica de los extractos etéreos, diclorometánicos y etanólicos de *Polysiphonia paniculata* Montagne de las muestras algales recolectadas en Barranco (B), Pisco (PS) y Paracas (Pa)

REACTIVO	METABOLITOS SECUNDARIOS	EXTRACTO ETÉREO			EXTRACTO DICLOROMETANICO			EXTRACTO ETANÓLICO		
		B	PS	PA	B	PS	PA	B	PS	PA
MOLISH	CARBOHIDRATOS	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
ANTRONA	CARBOHIDRATOS	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
FEHLING	AZUCARES REDUCTORES	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
NINHIDRINA	AMINOÁCIDOS	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
FeCl ₃	FENÓLICOS	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
SHINODA	FLAVONOIDES (ISOFLAVONA)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
LIEBERMANN BUCKCHARD	ESTEROIDES	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
DRAENDORFF	ALCALOIDES	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
MAYER	ALCALOIDES	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
BERTRAND	ALCALOIDES	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
ESPUMA	SAPONINAS	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
GELATINA	TANINOS	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
VAINILLINA	TERPENOS	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)

Legenda: Presente (+), ausente (-)

4.2. Cuantificación de fenoles totales

La figura 16 representa la curva de calibración del ácido gálico utilizado como patrón de referencia para la cuantificación de fenoles totales en los extractos en etér, DCM y etanol de las tres zonas de recolección (Barranco, Pisco y Paracas)

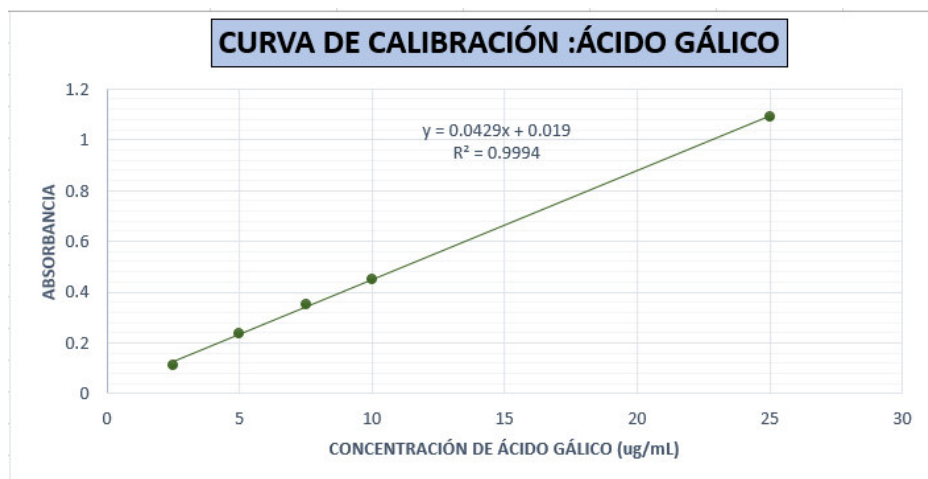


Figura 17. Curva de calibración del ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

En la Tabla 7 se reportan los contenidos de fenoles totales en cada extracto según la zona de recolección, se observa que los extractos de Barranco en suma presentan el mayor contenido de fenoles totales, seguido de los extractos de Paracas y finalmente los extractos de Pisco. El extracto DCM de Barranco presenta el mayor contenido de compuestos fenólicos con una concentración de 1.752 mg EAG/g extracto seco, seguido de su extracto etanólico con 1.426 mg EAG/g extracto seco. El extracto etanólico de Paracas presenta mayor contenido de fenoles totales que su extracto DCM con 1.614 y 1.264 mg EAG/g extracto seco respectivamente. Los extractos de Pisco presentan una baja concentración de fenoles totales, su extracto DCM contiene 0.596 mg EAG/g extracto seco y su extracto etanólico contiene 0.634 mg EAG/g extracto seco. Los extractos etéreos de las 3 zonas de recolección presentan menor contenido de compuestos fenólicos con una concentración de 0.3175 mg EAG/g en Barranco, 0.5936 mg EAG/g en Pisco y 0.54 mg EAG/g en Paracas.

Tabla 7. Contenido de Fenoles Totales de los extractos en éter, DCM y etanol de las tres zonas de recolección.

CONTENIDO DE FENOLES TOTALES mg EAG/g extracto seco			
ZONA DE RECOLECCIÓN	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO DICLOROMETANICO	EXTRACTO ETANÓLICO
BARRANCO	0.3175	1.752	1.426
PISCO	0.5936	0.596	0.634
PARACAS	0.54	1.264	1.614

Las concentraciones de fenoles totales obtenidos mediante el método de Folin-Ciocalteu de los extractos éter, diclorometano y etanol de las tres zonas de recolección son graficados en la Figura 17.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se observan en el anexo III.

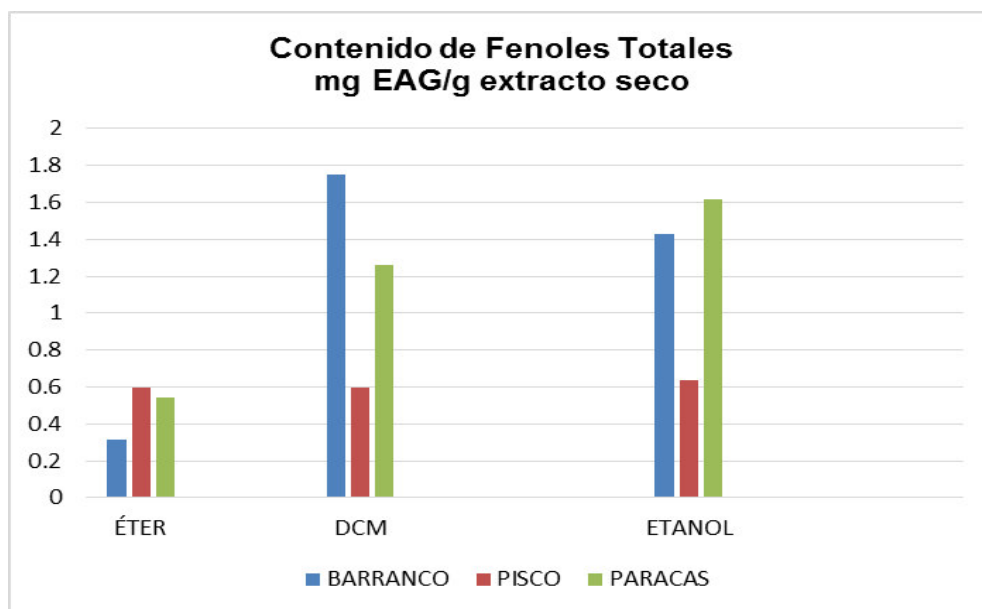


Figura 18. Determinación del Contenido de Fenoles Totales por el método de Folin-Ciocalteu

4.3. Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH

Según se observa en la Tabla 8 y figura 19, los extractos de diclorometano de Barranco, Pisco y Paracas presentan mayor capacidad atrapadora de radicales libres que sus respectivos extractos de etanol y éter de petróleo. Siendo el extracto DCM de Paracas el que presenta mayor actividad antioxidante con un CI_{50} de 300.19 $\mu\text{g/mL}$, seguido de DCM Barranco (CI_{50} : 357 $\mu\text{g/mL}$) y finalmente DCM de Pisco (CI_{50} : 366.6 $\mu\text{g/mL}$), sin embargo los valores de CI_{50} son mucho menores que el obtenido por el estándar vitamina C (CI_{50} : 2.4 $\mu\text{g/mL}$).

Los extractos etanólicos presentan mediana actividad antioxidante y los extractos etéreos presentan escasa actividad.

Si bien el extracto DCM de Paracas presentó mayor capacidad antioxidante que todos los extractos restantes, sin embargo, su cantidad de fenoles

totales fue menor que DCM Barranco y que los extractos etanólicos de las 3 zonas de recolección, lo que significa que los compuestos fenólicos que presenta tienen mejor capacidad para atrapar el radical DPPH.

Los resultados de CI_{50} obtenidos están respaldados por las curvas de calibración graficadas en las figuras 20 a 28 (anexo IV).

El análisis estadístico de los resultados se observa en el anexo V.

Tabla 8. Valores de CI_{50} (ug/mL) obtenidos de los extractos de las tres zonas de recolección. EP=éter de petróleo, DCM=diclorometano

Actividad antioxidante Valores de CI_{50} (ug/mL)				
Zona de recolección	Extracto EP	Extracto DCM	Extracto ETANOL	ESTANDAR VITAMINA C
BARRANCO	4693.79	357	1015.56	2.4
PISCO	6139.61	366.6	496.9	
PARACAS	6364.96	300.19	1071.15	

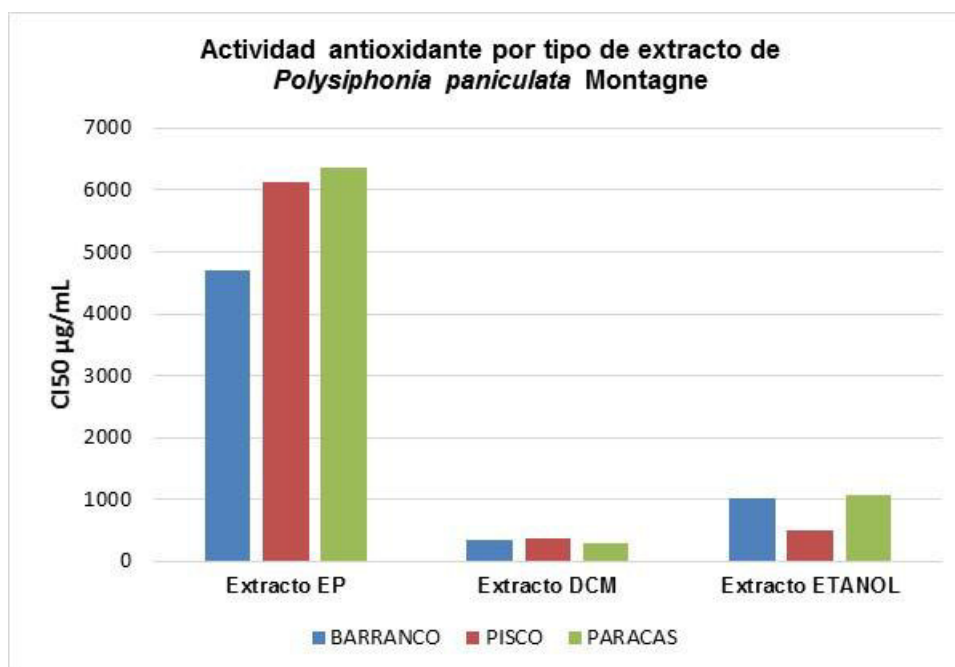


Figura 19. Cuadro comparativo de la actividad antioxidante de los extractos de las tres zonas de recolección, según el solvente de extracción. EP=éter de petróleo, DCM=diclorometano

4.4 Caracterización estructural del metabolito bromofenólico con actividad antioxidante

4.4.1 Identificación del grupo fenólico

4.4.1.1 Mediante cromatografía en capa fina

Los compuestos fenólicos de los extractos diclorometánicos fueron analizados mediante CCF en placas de Silicagel G60 F254. Antes de ser sprayados con la solución reveladora fueron visualizados bajo luz visible y luz UV a 254nm y 365nm, las manchas observadas se visualizan en las figuras 29, 30 y 31 (anexo VI). Una vez sprayados con la solución fosfomolíbdica se colocaron en la estufa a 100 °C por 5 minutos obteniendo manchas características de compuestos aromáticos (figura 32-anexo VI).

Los cromatogramas revelaron la presencia de compuestos aromáticos que fueron coloreados de azul. El reactivo revelador evidencia la presencia de fenoles y de moléculas antioxidantes (Stahl, 1965).

4.4.1.1.1 Aislamiento de fracciones identificadas como compuestos fenólicos

Considerando que el extracto diclorometánico de la muestra algal recolectada en Paracas presentó mayor actividad antioxidante se seleccionó este extracto para el aislamiento de las fracciones mediante cromatografía preparativa, con la finalidad de identificar los compuestos fenólicos.

Se emplearon las siguientes condiciones:

Fase estacionaria: placas de Silicagel G60 F254

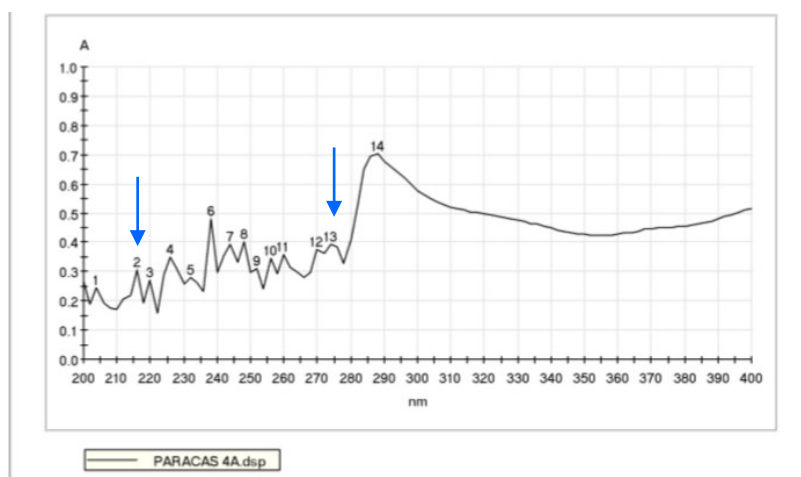
Fase móvil: N-butanol:benceno:agua (1:19:20) v/v

Revelador: ácido fosfomolíbdico al 2%, 100°C por 5 min.

El cromatograma dio lugar a una serie de manchas que corresponden a los diferentes metabolitos que conforman el extracto, al sprayar la cromatoplaça con el revelador se observan manchas azules, las fracciones obtenidas fueron numeradas del 1 al 5 (figuras 33 y 34-anexo VI). La fracción número 4 fue sometida a análisis por espectrofotometría UV-VIS y se determinó el punto de fusión de los cristales obtenidos.

4.4.1.2 Identificación de grupo fenólico mediante espectrofotometría UV-VIS

La fracción 4 cristalizada del extracto DCM del alga recolectada de Paracas se disolvió en etanol, esta solución brindó el espectro UV que se observa en la figura 35.



PARACAS 4A.dsp

Picos		Umbral: 0.01 A	
1	204 nm;	0.244 A	
4	226 nm;	0.349 A	
7	244 nm;	0.394 A	
10	256 nm;	0.345 A	
13	274 nm;	0.393 A	
2	216 nm;	0.305 A	
5	232 nm;	0.280 A	
8	248 nm;	0.402 A	
11	260 nm;	0.359 A	
14	288 nm;	0.703 A	
3	220 nm;	0.272 A	
6	238 nm;	0.481 A	
9	252 nm;	0.309 A	
12	270 nm;	0.377 A	

Figura 35. Espectro ultravioleta de la fracción 4 de *Polysiphonia paniculata* Montagne recolectada en Paracas.

Los picos a 216 nm y a 274 nm coinciden con lo reportado por Li et al. 2007, quienes proporcionaron información sobre características fisicoquímicas del compuesto bromofenólico: ácido 3-(3-bromo-4,5-dihidroxifenil)-2-(3,5-dibromo-4-hidroxifenil) propiónico, obtenido de *Polysiphonia urceolata*, cuya estructura química se observa en la figura 36.

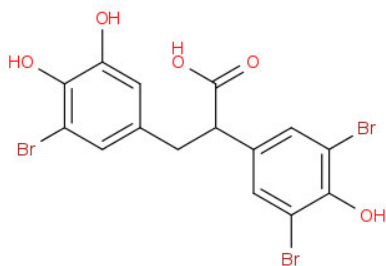


Figura 36. Ácido 3-(3-bromo-4,5-dihidroxifenil)-2-(3,5-dibromo-4-hidroxifenil) propiónico de *Polysiphonia urceolata* (Li et al., 2007)

Asimismo, el espectro UV de la fracción 4, del extracto DCM del alga recolectada de Paracas, presenta una banda a 288nm característico del ión fenóxido (Walton & Reyes,1983).

4.4.1.3 Identificación del compuesto fenólico mediante Punto de fusión

A la fracción 4 se le determinó el punto de fusión, obteniendo el rango 103-106°C, el cual coincide con lo reportado por Li et al. 2007, quienes para el compuesto: Ácido 3-(3-bromo-4,5-dihidroxifenil)-2-(3,5-dibromo-4-hidroxifenil) propiónico reportaron un punto de fusión de 103-105°C.

4.4.1.4 Identificación del compuesto fenólico mediante método espectrofotométrico infrarrojo

Se obtuvieron los espectros IR de los extractos DCM de las tres zonas de recolección: Barranco, Pisco y Paracas.

Los espectros IR de los extractos estudiados mostraron absorciones entre 3300 y 3400 cm^{-1} y entre 1500 y 1600 cm^{-1} , que de acuerdo a la literatura (Li et al., 2007) son bandas características para grupos hidroxilo y para anillos aromáticos respectivamente.

Se observan también los picos característicos del enlace C-Bromo, entre 710-750 cm^{-1} , que de acuerdo a la literatura (Rajasulochana, 2012; Tobias 1962) corresponden a la presencia de átomos de bromo en la estructura orgánica.

Los espectros IR son divulgados en las figuras 37, 38 y 39.

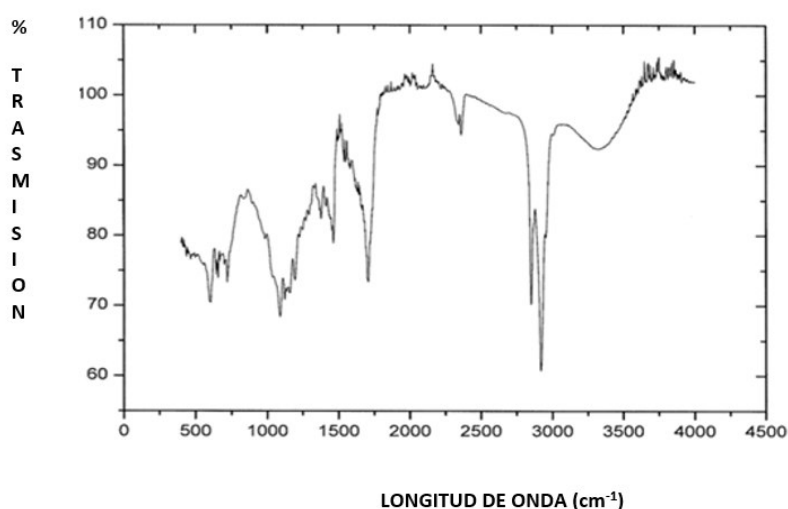


Figura 37. Espectro IR del extracto DCM de Barranco

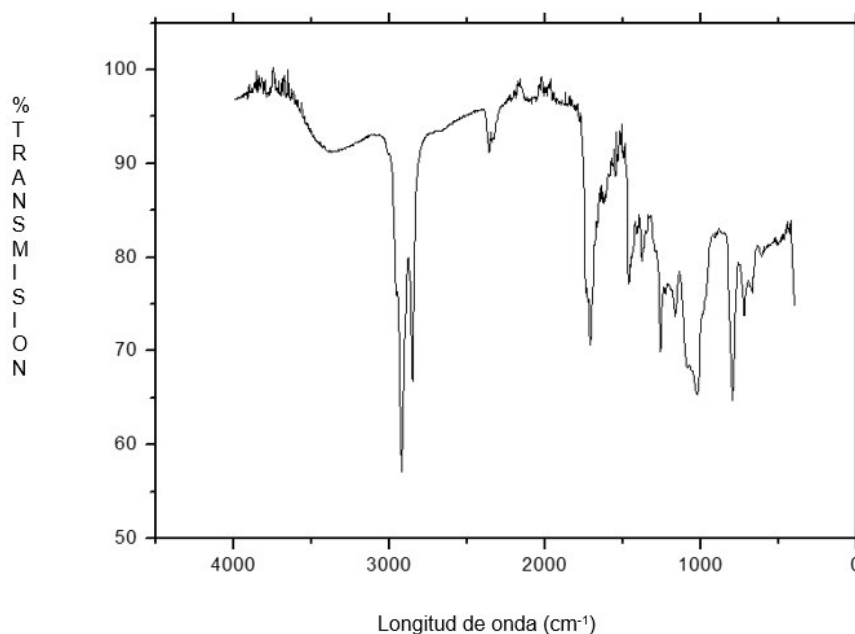


Figura 38. Espectro IR del extracto DCM de Pisco

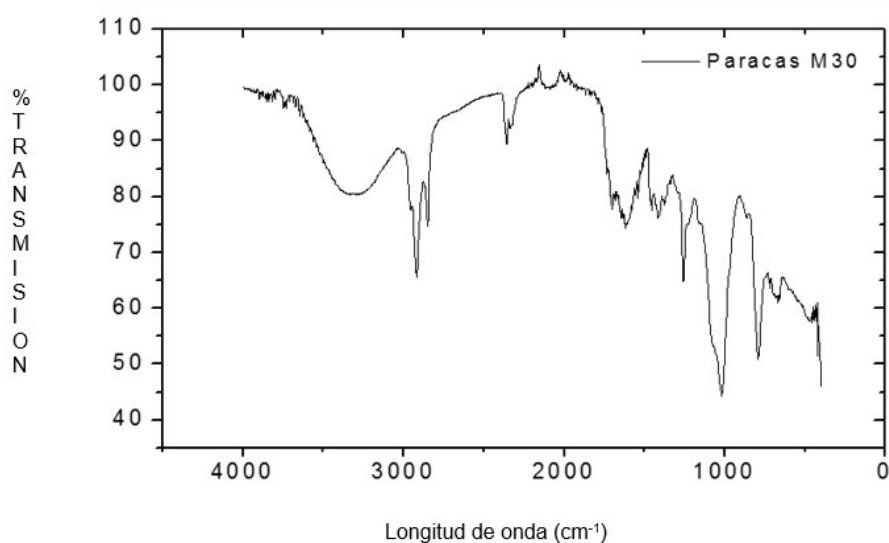


Figura 39. Espectro IR del extracto DCM de Paracas

4.4.2 Identificación de bromo

- Mediante reacciones cromogénicas

a) Detección por la fluoresceína tras la producción oxidativa de bromo. Luego de aplicar el procedimiento descrito por Feigl se obtuvieron las manchas rojas, indicativo de la presencia de bromo en los extractos de diclorometánicos de Barranco, Pisco y Paracas. Reacción positiva

b) Espectrometría de masa con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). La técnica ICP-MS permitió la identificación y cuantificación de bromo en los extractos algales de DCM de las tres zonas de recolección, Barranco, Pisco y Paracas lo cual coincide con los resultados cualitativos de Foster et al., 2014.

El extracto DCM de Paracas contiene mayor concentración de bromo (380.24 $\mu\text{g/g}$ extracto seco), seguido de DCM Barranco con 276.35 $\mu\text{g/g}$ extracto seco y luego DCM Pisco con 227.25 $\mu\text{g/g}$ extracto seco, como se observa en la Tabla 9.

La determinación de bromo por ICP-MS fue realizado por Laboratorios Bluffsfein (anexo VII).

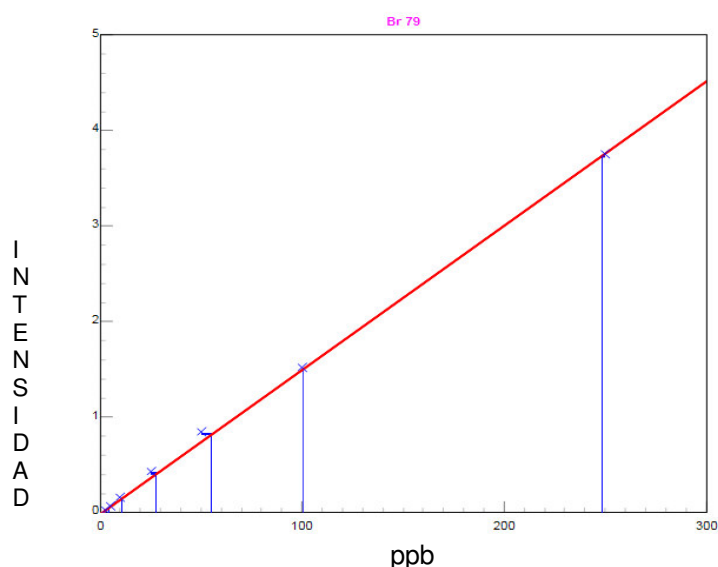


Figura 40. Curva de calibración de estándar bromuro de potasio en el análisis de bromo mediante la técnica ICP-MS de los extractos DCM de *Polysiphonia paniculata* Montagne

Tabla 9. Reporte de resultados de la determinación de bromo por ICP-MS

ENSAYOS	RESULTADOS
BROMO EN EXTRACTO DCM DE ALGA DE ZONA DE BARRANCO	276.35 μg bromo/g muestra
BROMO EN EXTRACTO DCM DE ALGA DE ZONA DE PARACAS	380.24 μg bromo/g muestra
BROMO EN EXTRACTO DCM DE ALGA DE ZONA DE PISCO	227.25 μg bromo/g muestra

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

Los extractos en éter de petróleo (EP), diclorometano (DCM) y etanol (ET) del alga *Polysiphonia paniculata* Montagne, recolectadas en las zonas de Barranco, Pisco y Paracas fueron analizadas para determinar el contenido de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu, los resultados evidenciaron que los extractos de la muestra algal de Barranco tienen el mayor contenido de fenoles totales, así el extracto DCM tiene 1.752 mg EAG/g extracto seco, el extracto ET tiene 1.426 mg EAG/g extracto seco y el extracto EP tiene 0.3175 mg EAG/g extracto seco. En segundo lugar están los extractos de Paracas, donde el extracto DCM tiene 1.264 mg EAG/g extracto seco, el extracto ET tiene 1.614 mg EAG/g extracto seco, y el extracto EP tiene 0.54 mg EAG/g extracto seco y finalmente los extractos de Pisco tienen bajos contenidos fenólicos donde el extracto DCM tiene 0.596 mg EAG/g extracto seco, el extracto ET tiene 0.634 mg EAG/g extracto seco y el extracto EP tiene 0.5936 mg EAG/g extracto seco.

Los contenidos de fenoles totales de los extractos de *Polysiphonia paniculata* M. están muy por debajo de los contenidos fenólicos totales de los extractos obtenidos de *Polysiphonia morrowii* estudiada por Je y col. (2009), donde en el extracto DCM se obtuvo 75 mg EAG/g de extracto, n-hexano: 7.875 mg EAG/g de extracto y metanol 90% 135.7 mg EAG/g de extracto; pero los valores de *P. paniculata* M. son superiores al contenido de fenoles totales obtenido por Echevarria y col. (2009), que estudió el extracto metanólico del alga roja *Laurencia sp.* y obtuvo un contenido de fenoles totales de 0.258 mg EAG/g de extracto.

La evaluación de la actividad antioxidante, de los extractos EP, DCM y ET del alga *Polysiphonia paniculata* Montagne, mediante el ensayo *in vitro* de captación de radicales DPPH, evidenció que los extractos DCM de Barranco, Pisco y Paracas tienen mayor capacidad antioxidante, con valores de CI_{50} de 357, 366.6 y 300.19 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, en comparación a los extractos ET que tienen valores de CI_{50} de 1015.56, 496.9 y 1071.15 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente y los extractos EP tienen muy escasa actividad antioxidante porque tienen valores de CI_{50} de 4693.79, 6139.61 y 6364.96 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Mayores capacidades antioxidantes fueron reportadas por

los investigadores Li et al., (2007) y Li, Gloer (2008), quienes mediante el método DPPH determinaron la actividad antioxidante de especies del género *Polysiphonia*. Li et al. (2007) estudiaron la actividad antioxidante del alga *Polysiphonia urceolata* (Costa de China), estableciendo que los bromofenoles de estructuras 1 a 4 (Figura 1), responsables de la actividad antioxidante, presentaron fuerte actividad (CI_{50} : 9.67 a 21.90 μ M) en comparación al BHT (CI_{50} : 83.84 μ M). Li, Gloer (2008), determinaron que el compuesto bromofenólico Urceolatin, de *Polysiphonia urceolata*, es 10 veces más potente que el control positivo Hidroxitoluenbutilado. Esta diferencia significativa entre los valores de CI_{50} de los extractos DCM de *P. paniculata* M. y los reportados por Li et al. (2007) y Li, Gloer (2008) al estudiar a *P. urceolata*, guarda relación con el hecho que los extractos analizados en la presente investigación son extractos crudos que contienen otros metabolitos además de los compuestos bromofenólicos, mientras que Li y Li-Gloer analizaron compuestos bromofenólicos aislados. Cabe señalar que los extractos DCM de *P. paniculata* presentan mayor actividad antioxidante que los extractos metanólicos de *Laurencia sp.* que presentó un CI_{50} de 770 μ g/mL. (Echevarria, 2009)

Por otro lado, se debe tener en cuenta lo manifestado por Liu et al. (2011) quien manifestó que no todas las algas rojas presentan un alto contenido de bromofenoles, lo cual guarda relación con su capacidad antioxidante. Asimismo, Liu afirmó que de acuerdo a los estudios reportados sobre bromofenoles y su relación con la actividad antioxidante soporta la idea que el número de grupos hidroxilo en las moléculas juega un rol vital para esta actividad. Otro factor importante es la conjugación, por ejemplo una estructura tipo dihidrofenantreno tiene mayor conjugación que una estructura formada por dos anillos fenólicos enlazados por un grupo etilo, presentando las estructuras con más conjugación mejor actividad antioxidante que las menos conjugadas. Asimismo indicó que, la brominación (el número de átomos de bromo en el compuesto fenólico) no es un factor determinante para la actividad antioxidante, en algunos casos su presencia incrementa ligeramente los valores de CI_{50} mientras que, comparando una estructura brominada con una similar menos brominada los valores de CI_{50} disminuyen ligeramente. Las afirmaciones de Liu corresponden con los porcentajes de

actividad antioxidante obtenidos de los extractos de *Polysiphonia paniculata* M., los compuestos fenólicos responsables de la actividad antioxidante presentan pocos grupos hidroxilo en su estructura, evidenciado por el alto porcentaje de transmitancia obtenido en el espectro Infrarrojo en las bandas entre 3300 y 3400cm⁻¹.

Con respecto a la variación de la actividad antioxidante en las muestras algales de las tres zonas de recolección (Barranco, Pisco y Paracas), se observa que la actividad antioxidante (CI50 en µg/mL) de los 3 extractos DCM son muy similares (B=357, PS=366.6 y PA=300.19). Estas se correlacionan con el contenido de fenoles totales. Por otro lado, el contenido de fenoles totales de los extractos etanólicos de Barranco y Paracas es mayor que el contenido de fenoles totales del extracto etanólico de Pisco (B=1.426 mg EAG/g, PS=0.634 mg EAG/g y PA=1.614 mg EAG/g) sin embargo el extracto de Pisco presenta mayor capacidad antioxidante que los extractos de Barranco y Paracas (B=1015.56 µg/mL, PS=496.9 µg/mL y PA=1071.15 µg/mL) estos hechos indican que la capacidad antioxidante de una muestra se debe al efecto combinado de diversos factores, como la presencia de otros metabolitos con capacidad antioxidante.

En *Polysiphonia paniculata* M., el contenido de bromo en el extracto DCM de las 3 zonas de recolección, se correlaciona con la capacidad antioxidante, así el extracto DCM Paracas presentó la mayor concentración de bromo, seguido de DCM Barranco y finalmente DCM Pisco. Las concentraciones de bromo en estos extractos son 380.24 µg/g de extracto seco en DCM Paracas, 276.35 µg/g en DCM Barranco y 227.25 µg/g en DCM Pisco. El estudio coincide con los hallazgos de Foster et al. 2014, que cuantificó bromo en extractos del alga *Undaria pinnatifida* (wakame), encontrando una concentración de bromo de 396 µg/g.

Con respecto a la identificación de compuestos bromofenólicos en los extractos DCM de Barranco, Pisco y Paracas, el estudio por métodos cromogénicos, espectroscópicos (IR) y espectrométricos (ICP-MS) identificó

la presencia de compuestos bromofenólicos en los extractos diclorometánicos.

La identificación de los compuestos fenólicos fue realizada mediante reacciones de color (con tricloruro férrico) y mediante cromatografía en capa fina obteniéndose manchas azul oscuro con el revelador ácido fosfomolibdico al 2%, característico de compuestos aromáticos, de acuerdo con Gumprecht, 1965. La identificación fue confirmada por espectroscopia infrarroja, dado que en los espectros obtenidos se observan las bandas características para grupos hidroxilo (entre 3300 y 3400 cm^{-1}) y para grupos aromáticos (entre 1400 y 1600 cm^{-1}) resultados que coinciden con los reportados por Li et al., 2007 & Liu et al., 2009.

La presencia de bromo en los extractos DCM, fue determinada por el característico color rojo del cambio de fluorescencia de color amarillo a eosina de color rojo, lo cual coincide con los resultados indicados por Feigl et al., 1978.

La identificación de bromo mediante espectroscopía infrarroja se obtuvo por la banda característica para el enlace C-Br entre 710 y 750 cm^{-1} lo que coincide con lo divulgado por Rajasulochana et. al., 2012 & Tobias, 1962.

Asimismo, la presencia de bromo fue confirmada por la técnica ICP-MS, que identificó bromo en los extractos DCM de las tres zonas de recolección, resultados que coinciden con la identificación realizada por Foster et al. 2014, quien determinó bromo en algas marinas empleando la técnica ICP-MS, demostrando ser una técnica muy sensible y específica para cada elemento que se pretende identificar.

La estructura química del metabolito presente en la fracción 4 del extracto diclorometánico de Paracas (extracto con mayor actividad antioxidante), ha sido establecido mediante CCF, espectrofotometría UV-VIS, punto de fusión e ICP-MS. Por CCF se obtuvieron manchas azul oscuro con el revelador ácido fosfomolibdico, característico de compuestos aromáticos, se obtuvieron valores de absorbancia a 216 nm y 274 nm y punto de fusión fue de 103-106°C, que coinciden con el compuesto Ácido 3-(3-bromo-4,5-dihidroxifenil)-2-(3,5-dibromo-4-hidroxifenil) propiónico con valores de absorbancia UV-VIS a 214 nm y 273 nm y punto de fusión de 103-105°C, reportado por Li et al. 2007.

El análisis de ICP-MS realizado al extracto DCM, confirma la presencia de átomos de bromo en la molécula.

Por los resultados obtenidos en las pruebas de contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de los extractos de las muestras algales de *Polysiphonia paniculata* M. recolectadas en Barranco, Pisco y Paracas, se puede establecer que la actividad antioxidante guarda relación directa con el contenido de compuestos bromofenólicos, la concentración de estos metabolitos depende de muchas variables como el hábitat del alga, la estación de recolección y las condiciones ambientales como luz, temperatura, y salinidad, y se debe considerar que el contenido de bromofenoles también varía con las especies, tal como lo señala Jiménez-Escrig et al. (2011).

Siendo el extracto en diclorometano de la muestra recolectada en Paracas el extracto con alto contenido fenólico y mayor actividad antioxidante se recomienda continuar con las investigaciones de esta especie con el fin de aislar compuestos bromofenólicos con potencial uso medicinal y aditivo alimenticio.

CONCLUSIONES

- 1.- Los contenidos fenólicos de los extractos etéreos, diclorometánicos y etanólicos de las muestras algales de *Polysiphonia paniculata* Montagne recolectadas en Barranco, Pisco y Paracas, determinados por el método de Folin-Ciocalteu (expresados en mg EAG/g de extracto seco), para los extractos etéreos fueron 0.3175, 0.5936 y 0.54 respectivamente, para los extractos diclorometánicos fueron 1.752, 0.596 y 1.264, respectivamente y para los extractos etanólicos fueron 1.426, 0.634 y 1.614, respectivamente.
- 2.- Los extractos etéreos, diclorometánicos y etanólicos de *Polysiphonia paniculata* Montagne recolectadas en Barranco, Pisco y Paracas mostraron actividad antioxidante *in vitro*, por el método DPPH. Los CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtenidos para los extractos etéreos fueron 4693.79, 6139.61 y 6364.96, respectivamente. Los CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtenidos para los extractos diclorometánicos fueron 357, 366.6 y 300.19 respectivamente. Y los CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtenidos para los extractos etanólicos fueron 1015.56, 496.9 y 1071.15 respectivamente.
- 3.- El extracto diclorometánico de la muestra algal de *Polysiphonia paniculata* Montagne recolectada en Paracas presenta el mayor contenido de compuestos bromofenólicos.
- 4.- La estructura química del metabolito presente en la fracción 4 del extracto diclorometánico de Paracas (extracto con mayor actividad antioxidante), establecido mediante cromatografía preparativa en capa fina, espectrofotometría UV-VIS, punto de fusión e ICP-MS, es semejante al compuesto ácido 3-(3-bromo-4,5-dihidroxifenil)-2-(3,5-dibromo-4-hidroxifenil) propiónico.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abdala-Díaz R, Cabello-Pasini A, Márquez-Garrido E, López F. (2014). Variación intratalo de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y actividad de la fenolsulfatasa en *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyceae) del sur de España. *Ciencias Marinas*, 40(1): 1-10.
2. Aguilar-Rosas R, Aguilar-Rosas L, Pedroche F. (2006). Descripción de talos espermatangiales y combinación de fases en *Polysiphonia confusa* (Rhodomelaceae, Rhodophycota). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 77: 1-6.
3. Algae base (2014).
URL:http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=f8d56857cf056304d&-session=abv4:AC1F26E50ecc902D1CtS8A0353F5
Accedido en: 2014-06-01
4. Alves C, David J, David J, Bahia M, Aguiar R. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Quimica Nova*, 33(10): 2202-2210
5. Balta, M. (1988). Producción de compuestos antimicrobianos en algas marinas peruanas. En: *Enteromorpha intestinales* (Chlorophyta) y *Polysiphonia paniculata* (Rhodophyta). [Tesis]. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
6. Baizabal R. (2010). Evaluación de la capacidad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial y del polvo de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) en queso fresco de vaca [Tesis]. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Escuela de Ingeniería, Universidad de las Américas Puebla, Mexico.

7. Batista A, Charles M, Manzini-Filho J, Vidal A. (2009). Las algas marinas como fuentes de fitofármacos antioxidantes. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(2): 1-18.
8. Bajpai V. (2016). Antimicrobial bioactive compounds from marine algae: A mini review. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 45(9): 1076-1085.
9. Beyer H, Walter W. *Manual de Química Orgánica*. 19a ed. Barcelona: Editorial Reverté S.A.; 1987
10. Bonnefoy M, Drai J, Kostka T. (2002). Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med*; 31: 1174-1184.
11. Bouhlal R, Riadi H, Bourgougnon N. (2013). Antioxidant activity of Rhodophyceae extracts from Atlantic and Mediterranean Coasts of Morocco. *African Journal of Plant Science*, 7(3): 110-117.
12. Bradley M. (2006). Biosynthesis of marine natural products: macroorganisms (Part B). *Natural Product Reports*, 23: 615–629.
13. Bravo L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11): 317-33.
14. Cabral de Oliveira A, Barros I, Oliveira M, Silva C, Henriques E, Salles M. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quimica Nova*, 32(3): 689-702.
15. Cabrita M, Vale C, Rauter A. (2010). Halogenated compounds from marine algae. *Marine Drugs*, 8: 2301-2317.
16. Cardenas C. (2017). Actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de *Prosopis pallida* “algarrobo”. [Tesis]. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.

17. Castro A, Juárez J, Ramon N, Suárez S, Retuerto F, Gonzalez S. (2011). Elucidación estructural del aceite esencial de *Ruta graveolens* L. ruda, actividad antioxidante y bioensayo de citotoxicidad. Ciencia e investigación; 14(1): 25- 28. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
18. Dembitsky V., Tolstikov G. (2003). Natural halogenated mononuclear phenol compounds and their derivatives. Chemistry for Sustainable Development, 11: 567–575.
19. Doshi G, Agarwal G, Martis E, Shanbhag P. (2011). Novel antibiotics from marine sources. International Journal of Pharmaceutical Sciences and nanotechnology, 4(3): 1447-1461.
20. Dutra F, Crespo R, Coelho M, Laneuville V. (2007). Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. Brazilian Journal Pharmacognosia, 17(4): 631-9.
21. Echevarría B, Franco A, Martínez A. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de microalgas del Caribe colombiano, 16(1), 126-131.
22. Elejalde J. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. Anales de Medicina Interna, 18(6): 326-335
23. Feigl F. Pruebas a la gota en análisis orgánico. 7ª ed. México: Editorial El Manual moderno S.A. 1978
24. Flodin C, Whitfield FB. (1999). Biosynthesis of bromophenols in Marine algae. Water Science and Technology, 40(6): 53-58
25. Flodin C., Whitfield FB. (2000). Brominated anisoles and cresols in the red alga *Polysiphonia sphaerocarpa*. Phytochemistry, 53(1):77-80

26. Forsyth W. (1955). Cacao polyphenolic substances 3. Separation and estimation on paper chromatograms. *Biochem Journal*, 60: 108-111
27. Foster M, Guerreiro M, Gonçalves I, Caldeira V, Rodrigo N, Piresb X. et al. (2014). Determinação de bromo e iodo em alga marinha comestível por ICP-MS após decomposição por combustão iniciada por micro-ondas. *Química Nova*, 37(6): 964-968.
28. Fusco D, Colloca G, Lo Monaco M, Cesari M. (2007). Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clinical Interview Aging*; 2: 377-387.
29. Galvan T, Guisado R, Garcia M, Ochoa J, Ocaña J. (2008). Antioxidantes y ejercicio físico: funciones de la melatonina. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*, 1(2):61-72.
30. Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D. (2002). Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev.*, 54(2): 71-84.
31. Gumprecht D. (1965) The paper chromatography of some isomeric monosubstituted phenols. I. *Journal of Chromatography*, 18:336-341.
32. Hader D, Lebert M, Helbling E. (2004). Variable fluorescence parameters in filamentous Patagonian rhodophytes, *Callithamnion gaudichaudii* C. Agardh (R) and *Ceramium* sp. under solar radiation. *Journal Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 73(1): 78-99.
33. Halliwell B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*; 35: 1147-1150.
34. Han L., Xu N., Shi J., Yan X., Zeng Ch. (2005). Isolation and pharmacological activities of bromophenols from *Rhodomela*

- confervoides**. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 23(2): 226-229.
35. Hansberg W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje Bioquímico, 26:19-54
36. Hernandez H. (2011). Desarrollo de nuevas técnicas para determinar actínidos en excretas por espectrometría de masas y técnicas radiométricas [Tesis doctoral] Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
37. Hollenberg G, Norris J. (1977). The red alga *Polysiphonia* (Rhodomelaceae) in the Northern Gulf of California. Smithsonian Institution Press. Washington D.C. 1-21.
38. Je J., Ahn Ch., Oh M., Kang S. (2009). Antioxidant activity of a red seaweed *Polysiphonia morrowii* extract. Food Science Biotechnology, 18(1): 124-129.
39. Jiménez-Escrig A, Gómez-Ordóñez E, Rupérez P. (2011). Brown and red seaweeds as potential sources of antioxidant nutraceuticals. J Appl Phycol. 77-86
40. Jirge S, Chaudhari Y. (2010). Marine: The ultimate source of bioactives and drug metabolites. International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy, 1(1): 55-62.
41. Kelman D, Kromkowski E, McDermid K, Tabandera N, Wright P, Wright A. (2012). Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. Mar Drugs. 10(2): 403–416.
42. Lamarque A, Zygodlo J, Labuckas D, López L, Torres M, Maestri D. (2008). Editorial Encuentro. 1a edición. Córdoba.

43. Lenis L, Benitez R, Salamanca E, Chito D. (2007). Extracción, separación y elucidación estructural de dos metabolitos secundarios del alga marina *Bostrychia calliptera*. *Scientia et Technica*, 33:97-102.
44. Li K, Li X, Ji N, Gloer J, Wang B. (2008). Urceolatin, a structurally unique bromophenol from *Polysiphonia urceolata*. *Organic Letters*, 10(7):1429-1432.
45. Li K, Li X, Ji N, Wang B. (2007). Natural bromophenols from the marine red alga *Polysiphonia urceolata* (Rhodomelaceae): structural elucidation and DPPH radical-scavenging activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(21): 6627-6631.
46. Li K, Li X, Ji N, Wang B. (2008). Bromophenols from the marine red alga *Polysiphonia urceolata* with DPPH radical scavenging activity. *Journal of Natural Products*, 71(1): 28-30.
47. Lin X, Liu M. (2012). Bromophenols from marine algae with potential anti-diabetic activities. *Journal Ocean Universidad de China*, 11(4): 533-538
48. Liu Q, Tan C, Zhang T, Han L, Fan X, et al. (2006). Urceolatol, a tetracyclic bromobenzaldehyde dimer from *Polisysiphonia urceolata*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 8(4): 379-383.
49. Liu Q, Qiao Q, Zhang T, Sun L, Wang M. (2009). The structure elucidation of a new bromophenol metabolite from *Polysiphonia urceolata* by experimental and DFT theoretical methods. *Journal of Molecular Structure*, 929: 1-5.
50. Liu M, Hansen P, Lin X. (2011). Bromophenols in marine algae and their bioactivities. *Marine Drugs* ,9: 1273-1292;
51. Lock, O. (1994). Investigación Fitoquímica. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2da. Edición. Lima.

52. Machu L, Misurcova L, Ambrozova J, Orsavova J, Mlcek J, Sochor J, et al. (2015). Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules*. 20(1): 1118-1133.
53. Matsukawa R, Dubinsky Z, Kishimoto E, Masaki K, Masuda Y, Takeuchi T. (1997). A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal Applied Phycology*, 9(1): 29-35.
54. Mauri A, Llobat M, Herráez M. (2010). Laboratorio de Análisis Instrumental. Publicaciones de la Universidad de Valencia. Valencia.
55. Munir N, Sharif N, Naz Sh, Manzoor F. (2013). Algae: A potent antioxidant source. *Sky Journal of Microbiology Research*, 1(3): 22-31.
56. Namiki M. (1990). Antioxidants/antimutagenics in foods. *CRC Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition*, 29(1): 273-300.
57. Nguyen T, Ludwig R. (2014). Quantitative determination of bromine and iodine in food samples using ICP-MS. *Analytical Service*, 30: 1089-1092
58. Oumaskour K, Boujaber N, Etahiri S, Assobhei O. (2013). Anti-inflammatory and antimicrobial activities of twenty-three marine red algae from the coast of Sidi Bouzid (El Jadida-Morocco). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3): 145-149.
59. Papas A. (1999). Antioxidant status. *Diet, Nutrition and Health*. CRC Press. Florida-Estados Unidos.
60. Pérez M, Falqué E, Domínguez H. (2016), Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. *Marine Drugs*, 14:1-28.
61. Rajasulochana P, Krishnamoorthy P, Dhanotharam R. (2012). Isolation, identification of bromophenol compound and antibacterial activity of

- Kappaphycus* sp. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 3(2): 173-186.
62. Robbins, R. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. J. Agric. Food Chem. 51: 2866-2887.
 63. Rozema J, Bjorn L., Bornman J, Gaberscik A, Hader D, Trost T. (2002). The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. Journal Photochemistry and Photobiology B., 66(1): 2-12.
 64. Sampayo V. (2011). Establecimiento de un método de separación de litio en microcolumnas empleando una resina de intercambio iónico [Tesis]. Facultad de Ingeniería Ambiental. Universidad Tecnológica de Querétaro. Querétaro.
 65. Sanchez-Valle V, Mendez-Sanchez N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. Revista de Investigación Médica Sur Mexicana, 20(3): 161-168.
 66. Se-Kwon Kim, (2015) Handbook of Marine Biotechnology. 1a ed. Springer Verlag Berlin.
 67. Shick J, Dunlap W. (2002). Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. Annual Review of Physiology, 64(1):223-62.
 68. Stahl E, (1965) Thin-Layer Chromatography. Academic Press Inc. Publishers, New York.
 69. Tobias D, Infrared absorption spectra of trisubstituted phenol derivatives. Physical Sciences. Proceeding of the Oklahoma Academy of Science for 1962. 183-187.

70. Tovar J. (2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera. [Tesis]. Escuela de Tecnología Química, Facultad de Tecnología. Universidad Tecnológica de Pereira-Pereira.
71. Venero, J. (2002) Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Revista Cubana Médico Militar, 31(2): 126-133.
72. Walton H, Reyes J. (1983). Análisis Químico e Instrumental Moderno. Editorial Reverté S.A. Barcelona
73. Yildiz G, Vatan O, Celikler S, Dere S. (2011). Determination of the phenolic compounds and antioxidative capacity in red algae *Gracilaria bursa-pastoris*. International Journal of Food Properties, 14:496-502.
74. Yale E, Acleto C, Foldvik N. (1964). The seaweeds of Perú. Editorial Verlag von J. Cramer Weinheim.

ANEXO I

Mapas de ubicación de los lugares de recolección del alga
Polysiphonia paniculata M.



Mapa de ubicación Playa Barranco- Distrito de Barranco. Región Lima



Mapa de ubicación de la playa Punta Rocas-Pisco y playa Lagunillas-Paracas, Región Ica.

ANEXO II



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la buena atención al ciudadano"

CONSTANCIA N° 113-USM-2017

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (alga roja) recibida de la Q.F. **Belén Guadalupe GONZALEZ GONZALEZ**, alumna de la Maestría en Recursos Vegetales y Terapéuticos de la UPG, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: ***Polysiphonia paniculata*** Montagne, y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Guiry, M.D & Guiry G.M. 2010, Algae Base:

DIVISION: RHODOPHYTA

CLASE: FLORIDEOPHYCEAE

SUBCLASE: RHODYMENIOPHYCIDA

ORDEN: CERAMIALES

FAMILIA: RHODOMELACEAE

GENERO: *Polysiphonia*

ESPECIE: *Polysiphonia paniculata* Montagne


Nombre vulgar: "polisifonia"

REGIST. USM: 298412

Determinado por: Blgo. Mario Benavente Palacios

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 21 junio de 2017


MAG. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



ACE/ddb

ANEXO III

Análisis estadístico de los resultados de la determinación del contenido de Fenoles Totales

Regresión lineal para la curva de calibración del ácido gálico

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	1,000 ^a	,999	,999	,01108

a. Variables predictoras: (Constante), CONCENTRACIÓN DE ACIDO GALICO (ug/mL)

ANOVA^a

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	,577	1	,577	4697,211	,000 ^b
	Residual	,000	3	,000		
	Total	,577	4			

a. Variable dependiente: ABSRBANCIA

b. Variables predictoras: (Constante), CONCENTRACIÓN DE ACIDO GALICO (ug/mL)

Coefficientes^a

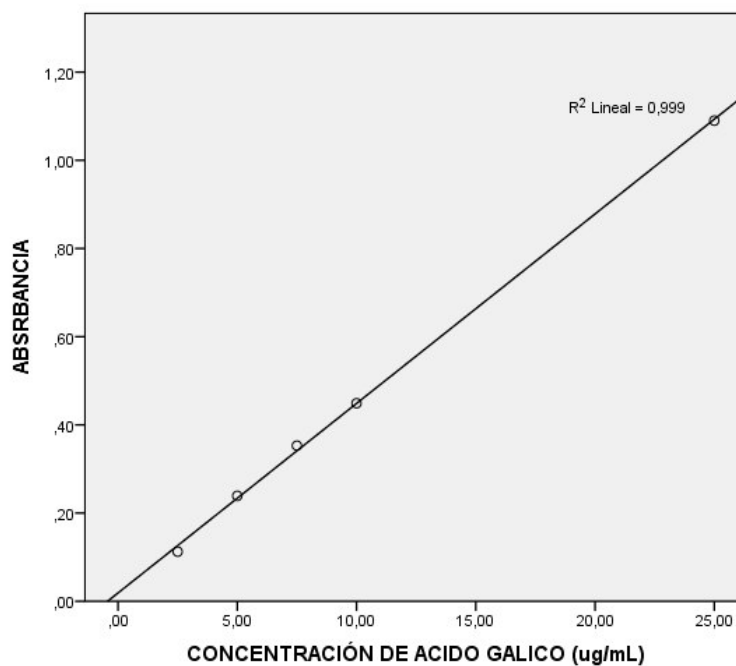
Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	,019	,008		2,375	,098
	CONCENTRACIÓN DE ACIDO GALICO (ug/mL)	,043	,001	1,000	68,536	,000

a. Variable dependiente: ABSRBANCIA

R² = 99%

Y = BX + A → 0.043X + 0.019 = Y

Este resultado corrobora al observado en regresión lineal de Excel adjuntado



ANEXO IV

Curvas de Calibración para la cuantificación de la actividad antioxidante por el método DPPH

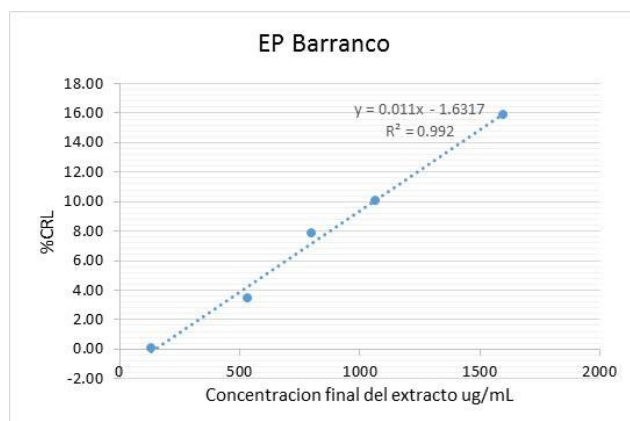


Figura 20. Curva de calibración del extracto en éter de petróleo de Barranco (método DPPH)

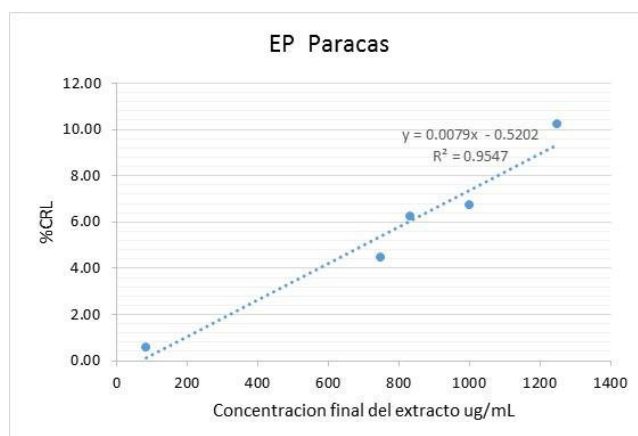


Figura 21. Curva de calibración del extracto en éter de petróleo de Paracas (método DPPH)

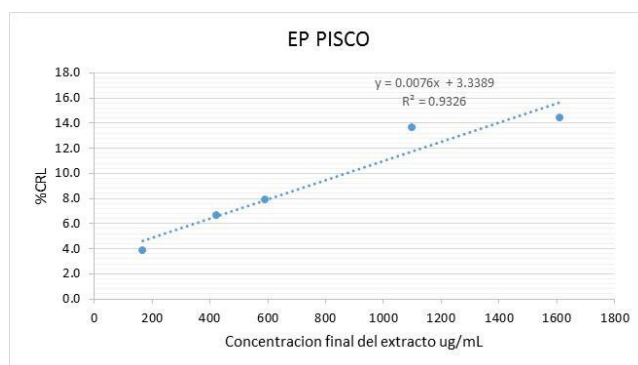


Figura 22. Curva de calibración del extracto en éter de petróleo de Pisco (método DPPH)

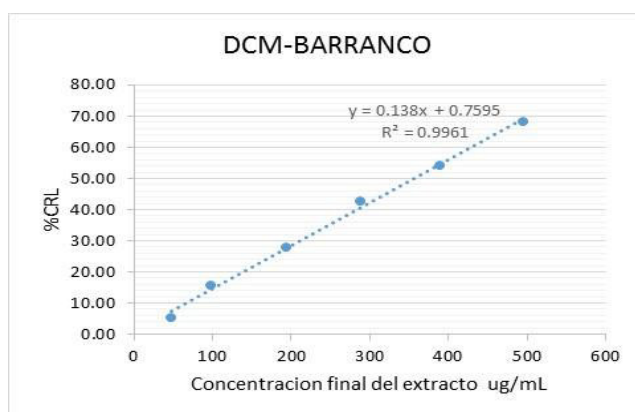


Figura 23. Curva de calibración del extracto en diclorometano de Barranco (método DPPH)

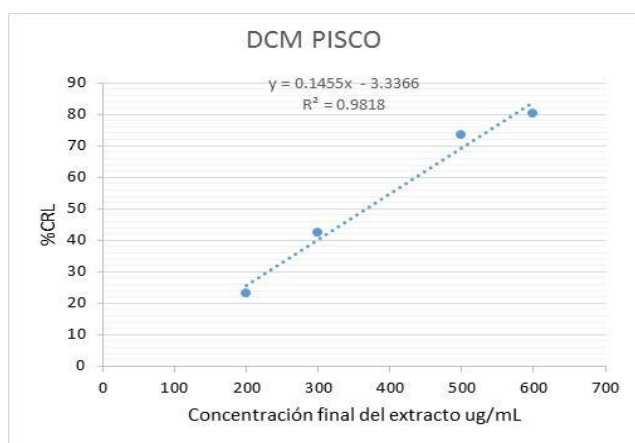


Figura 24. Curva de calibración del extracto en diclorometano de Pisco (método DPPH)

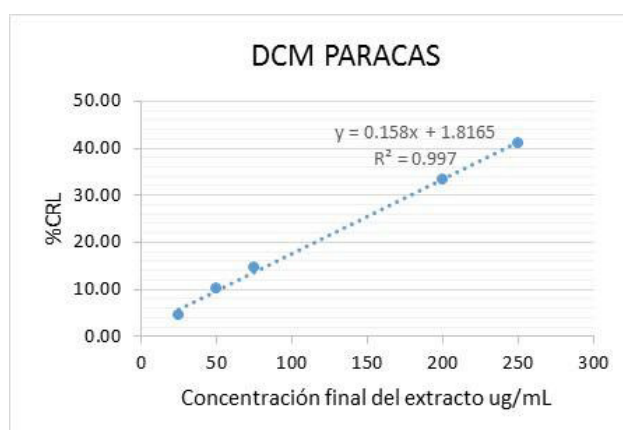


Figura 25. Curva de calibración del extracto en diclorometano de Paracas (método DPPH)

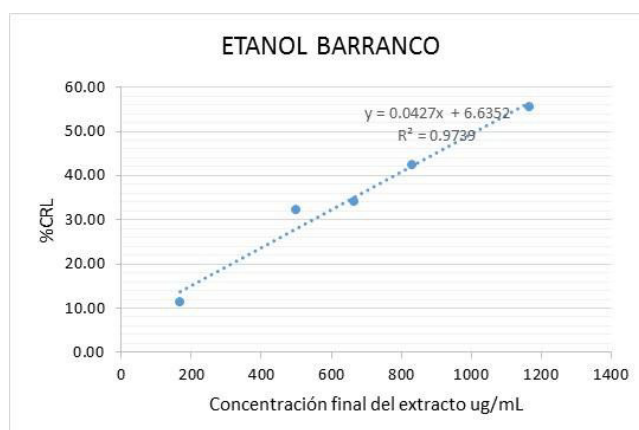


Figura 26. Curva de calibración del extracto en etanol de Barranco (método DPPH)

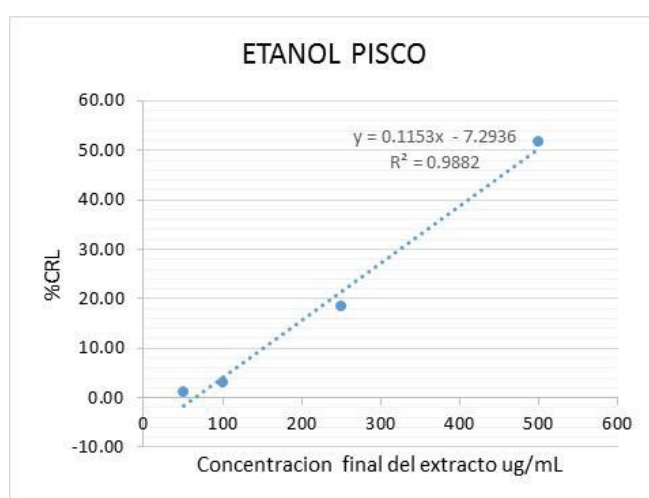


Figura 27. Curva de calibración del extracto en etanol de Pisco (método DPPH)

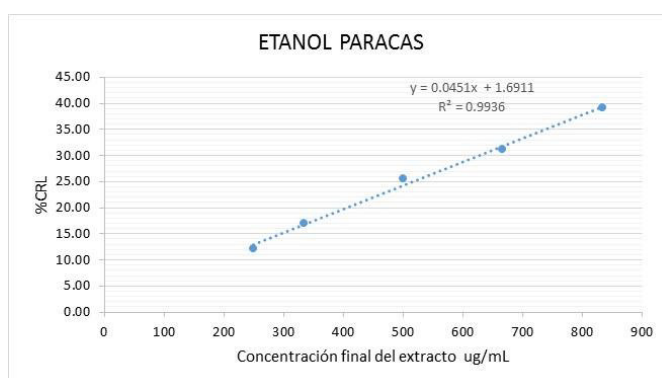


Figura 28. Curva de calibración del extracto en etanol de Paracas (método DPPH)

ANEXO V

Análisis estadístico de los resultados de la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH

Análisis de regresión lineal de los extractos analizados: DICLOROMETANO PARACAS

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,999 ^a	,997	,996	,98522

a. Variables predictoras: (Constante), VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)

ANOVA^a

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	980,010	1	980,010	1009,626	,000 ^b
	Residual	2,912	3	,971		
	Total	982,922	4			

a. Variable dependiente: % CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE

b. Variables predictoras: (Constante), VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	1,816	,742		2,449	,092
	VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)	,053	,002	,999	31,775	,000

a. Variable dependiente: % CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE

DICLOROMETANO BARRANCO

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,998 ^a	,996	,995	1,65076

a. Variables predictoras: (Constante), VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)

ANOVA^a

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	2813,949	1	2813,949	1032,636	,000 ^b
	Residual	10,900	4	2,725		
	Total	2824,849	5			

a. Variable dependiente: % CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE

b. Variables predictoras: (Constante), VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	,759	1,277		,595	,584
	VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)	,046	,001	,998	32,135	,000

a. Variable dependiente: % CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE

DICLOROMETANO PISCO

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,991 ^a	,982	,973	4,42404

a. Variables predictoras: (Constante), CONCENTRACIÓN (ug/mL)

ANOVA^a

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	2115,861	1	2115,861	108,106	,009 ^b
	Residual	39,144	2	19,572		
	Total	2155,005	3			

a. Variable dependiente: %CAPTACIÓN RADICAL LIBRE

b. Variables predictoras: (Constante), CONCENTRACIÓN (ug/mL)

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	-3,334	6,017		-,554	,635
	CONCENTRACIÓN (ug/mL)	,145	,014	,991	10,397	,009

a. Variable dependiente: %CAPTACIÓN RADICAL LIBRE

ETANÓLICO PARACAS

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,998 ^a	,996	,995	1,65076

a. Variables predictoras: (Constante), VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)

ANOVA^a

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	2813,949	1	2813,949	1032,636	,000 ^b
	Residual	10,900	4	2,725		
	Total	2824,849	5			

a. Variable dependiente: % CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE

b. Variables predictoras: (Constante), VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	,759	1,277		,595	,584
	VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)	,046	,001	,998	32,135	,000

a. Variable dependiente: % CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE

ETANÓLICO PISCO

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,976 ^a	,952	,940	4,97127

a. Variables predictoras: (Constante), VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)

ANOVA^a

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	1973,347	1	1973,347	79,849	,001 ^b
	Residual	98,854	4	24,714		
	Total	2072,201	5			

a. Variable dependiente: % CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE

b. Variables predictoras: (Constante), VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	-4,995	3,219		-1,552	,196
	VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)	,034	,004	,976	8,936	,001

a. Variable dependiente: % CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE

ETANÓLICO BARRANCO

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,987 ^a	,975	,966	3,21843

a. Variables predictoras: (Constante), VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)

ANOVA^a

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	1188,770	1	1188,770	114,765	,002 ^b
	Residual	31,075	3	10,358		
	Total	1219,845	4			

a. Variable dependiente: % CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE

b. Variables predictoras: (Constante), VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	-,993	3,218		-,309	,778
	VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)	,015	,001	,987	10,713	,002

a. Variable dependiente: % CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE

ÉTER DE PETRÓLEO PARACAS

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,977 ^a	,955	,940	,86293

a. Variables predictoras: (Constante), VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)

ANOVA^a

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	47,117	1	47,117	63,274	,004 ^b
	Residual	2,234	3	,745		
	Total	49,351	4			

a. Variable dependiente: % CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE

b. Variables predictoras: (Constante), VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	-,521	,867		-,600	,591
	VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)	,003	,000	,977	7,954	,004

a. Variable dependiente: % CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE

ÉTER DE PETRÓLEO PISCO

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,966 ^a	,932	,910	1,36532

a. Variables predictoras: (Constante), VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)

ANOVA^a

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	77,252	1	77,252	41,442	,008 ^b
	Residual	5,592	3	1,864		
	Total	82,845	4			

a. Variable dependiente: % CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE

b. Variables predictoras: (Constante), VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	3,337	1,108		3,013	,057
	VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)	,003	,000	,966	6,438	,008

a. Variable dependiente: % CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE

ÉTER DE PETRÓLEO BARRANCO

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,949 ^a	,901	,851	5,85167

a. Variables predictoras: (Constante), VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)

ANOVA^a

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	620,185	1	620,185	18,112	,051 ^b
	Residual	68,484	2	34,242		
	Total	688,669	3			

a. Variable dependiente: % CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE

b. Variables predictoras: (Constante), VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	-16,990	7,974		-2,131	,167
	VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)	,011	,002	,949	4,256	,051

a. Variable dependiente: % CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE

ESTÁNDAR VITAMINA C

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,994 ^a	,988	,983	3,76954

a. Variables predictoras: (Constante), VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)

ANOVA^a

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	2421,760	1	2421,760	170,433	,006 ^b
	Residual	28,419	2	14,209		
	Total	2450,179	3			

a. Variable dependiente: % CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE

b. Variables predictoras: (Constante), VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	-12,330	4,617		-2,671	,116
	VALORES DE CONCENTRACIÓN (ug/mL)	8,803	,674	,994	13,055	,006

a. Variable dependiente: % CAPTACIÓN DE RADICAL LIBRE

ANEXO VI
Caracterización estructural del metabolito bromofenólico con actividad antioxidante mediante Cromatografía en Capa Fina

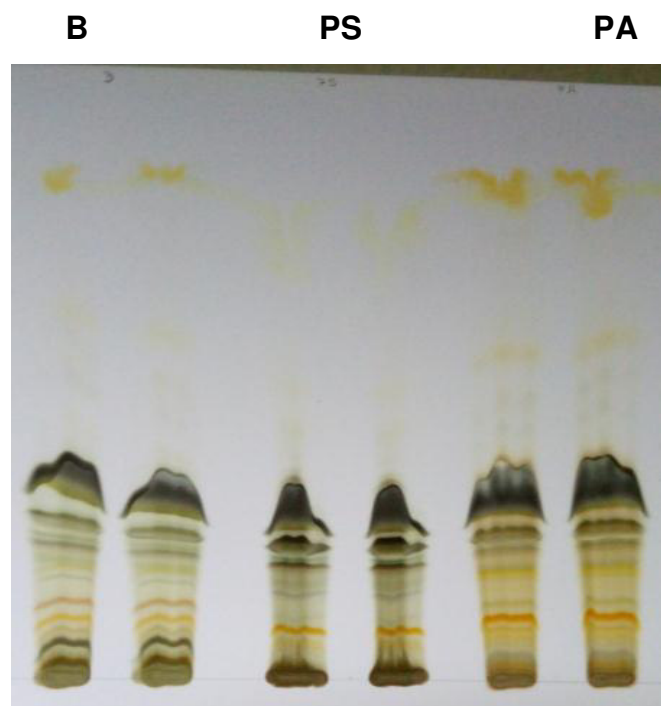


Figura 29. Cromatograma de los extractos DCM de *Polysiphonia paniculata* Montagne. B=Barranco, PS=Pisco y PA=Paracas. Fase móvil: N-butanol:benceno:agua (1:19:20) observado a la luz visible.

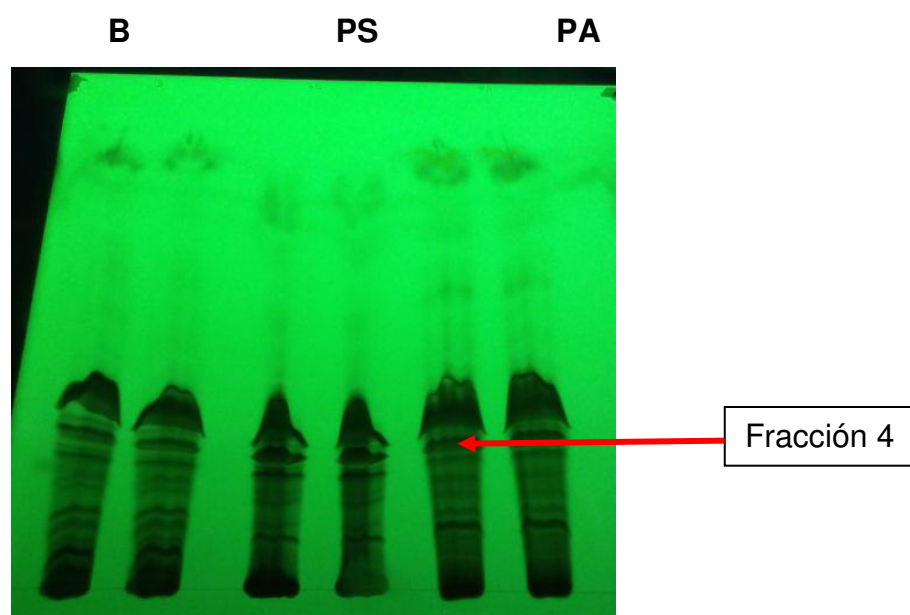


Figura 30. Cromatograma de los extractos DCM de *Polysiphonia paniculata* Montagne. B=Barranco, PS=Pisco y PA=Paracas. Fase móvil: N-butanol:benceno:agua (1:19:20), observado a la luz UV 254nm

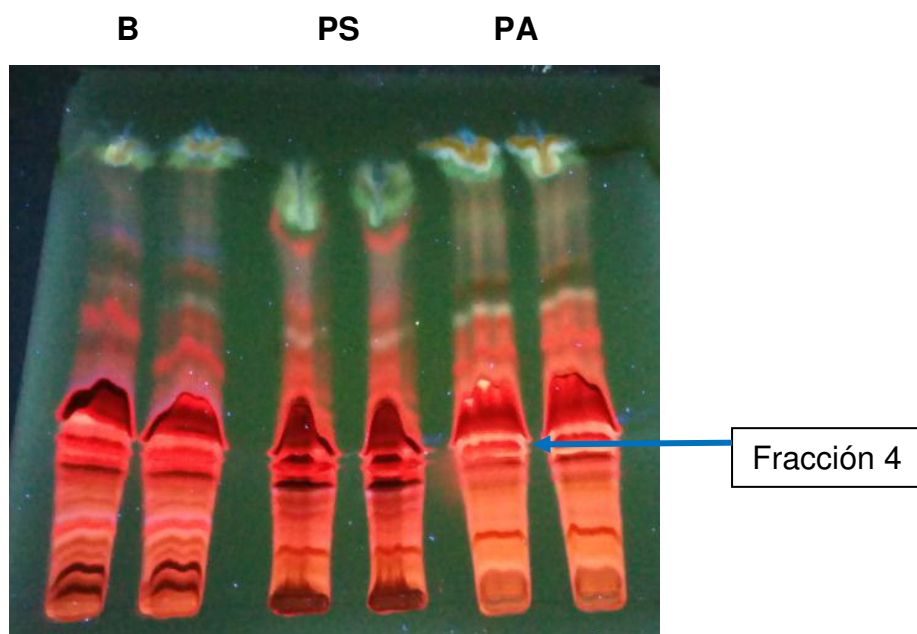


Figura 31. Cromatograma de los extractos DCM de *Polysiphonia paniculata* Montagne. B=Barranco, PS=Pisco y PA=Paracas. Fase móvil: N-butanol:benceno:agua (1:19:20), observado a la luz UV 365nm

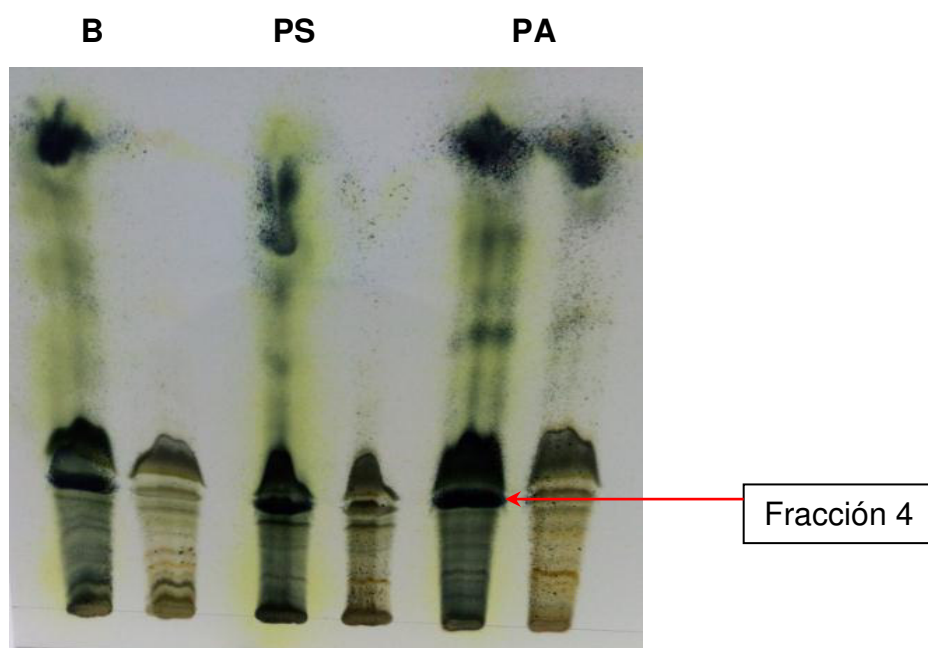


Figura 32. Cromatograma de los extractos DCM de *Polysiphonia paniculata* Montagne. B=Barranco, PS=Pisco y PA=Paracas. Fase móvil: N-butanol:benceno:agua (1:19:20), revelado con ácido fosfomolibdico al 2%, 100°C por 5 min. Fracción 4 aislada por cromatografía en escala preparativa.

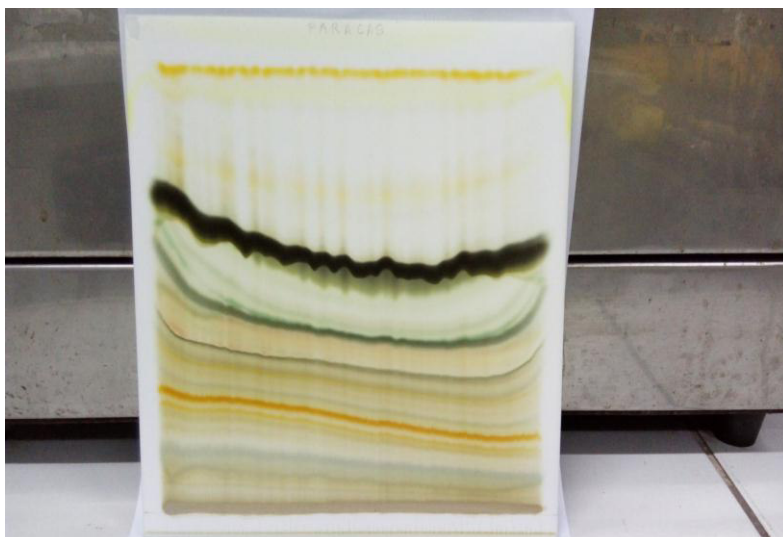


Figura 33. Cromatograma a escala preparativa para el aislamiento de compuestos fenólicos en el extracto DCM de *Polysiphonia paniculata* M. recolectada en Paracas.

Fase móvil: N-butanol:benceno:agua (1:19:20)

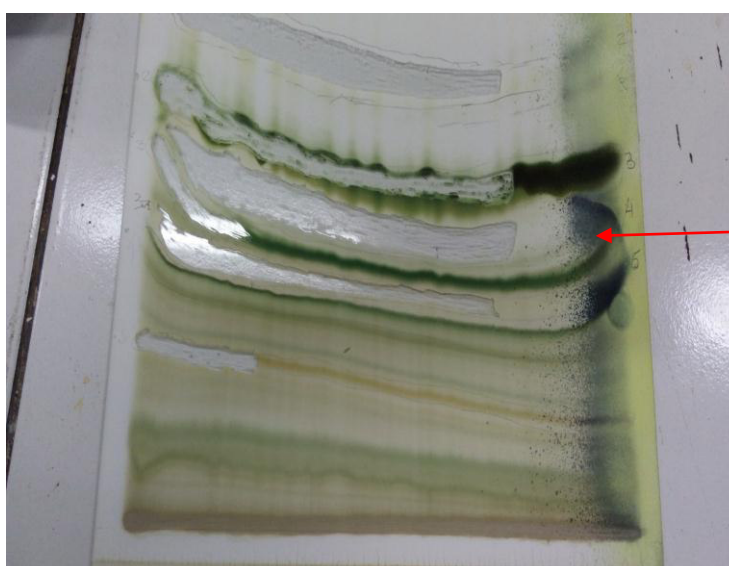


Figura 34. Ubicación de la fracción 4 en el cromatograma a escala preparativa para el aislamiento de compuestos fenólicos en el extracto DCM de *Polysiphonia paniculata* M. recolectada en Paracas.

Fase móvil: N-butanol:benceno:agua (1:19:20)

ANEXO VII
Determinación de Bromo mediante la técnica Espectrometría de
Masa con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)



CERTIFICADO DE ANÁLISIS N° 024-2017

PRODUCTO:	EXTRACTO DE ALGAS
METAL:	BROMO
FECHA DE INGRESO:	2017.05.25
FECHA DE ANÁLISIS:	2017.05.26
NORMA TÉCNICA:	TECNICA PROPIA

ENSAYOS	RESULTADOS
BROMO EN EXTRACTO DE ALGA DE ZONA DE BARRANCO	276.35 ug bromo/g muestra
BROMO EN EXTRACTO DE ALGA DE ZONA DE PARACAS	380.24 ug bromo/g muestra
BROMO EN EXTRACTO DE ALGA DE ZONA DE PISCO	227.25 ug bromo/g muestra


Q.F. Edgard Valentin Atocha.
Edgard Valentin Atocha
JEFE DE AREA DE TOXICOLOGIA